



**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CURA DO HIV – BARREIRAS E PERSPETIVAS FUTURAS**

Trabalho submetido por  
**Mónica Graça Correia**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**outubro de 2018**





**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CURA DO HIV: BARREIRAS E PERSPETIVAS FUTURAS**

Trabalho submetido por  
**Mónica Graça Correia**  
para a obtenção do grau de **Mestre** em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Professor Doutor Nuno Taveira**

**outubro de 2018**



## **Dedicatória**

Ao meu avô, pelo grande Homem que sempre foi.

Pelo seu enorme coração, pela sua extrema dedicação à família.

Pelo seu sentido de humor, sempre capaz de nos colocar um sorriso na cara,  
e de nos fazer soltar uma gargalhada.

Ensinaste-me tanta coisa, mesmo sem tentar.

Ensinaste-me a ser forte, só de te ver lutar.

**Estarás para sempre no meu coração, avô Mário Sérgio.**



## **Agradecimentos**

Ao **Professor Doutor Nuno Taveira**, pela excelente orientação e por todo o seu apoio incansável; por tudo o que me ensinou durante o meu percurso académico.

Ao meu **Pai**, que sempre foi o meu grande pilar ao longo, não só do meu percurso académico, como em toda a minha vida. Que esteve sempre presente, nos bons e maus momentos, que se assegurou de que lutaria por todos os meus sonhos, tal como fez com os dele. És uma inspiração para mim.

À minha **Mãe**, pela enorme guerreira que és; por me ter ensinado a sê-lo também. Por me ter confortado quando precisei, e me ter feito ver a vida com mais luz. Por me motivar a ser quem sou todos os dias, e por ser, acima de tudo, uma enorme amiga.

Aos meus queridos amigos e colegas, **Inês Ribeiro, Marco Correia, Nuno Santos, Rafael Godinho, Sara Machado, Sofia Pintado, Soraia Garcia, Suse Pires, Telma Amorim, e Tiago Alexandre**, que foram das pessoas que tive mais orgulho em conhecer ao longo deste meu percurso. Adorei todos os momentos passados convosco, momentos que nunca vou esquecer. Obrigada pelas gargalhadas e, ao mesmo tempo, pelo apoio incondicional.

À minha melhor amiga, **Ana Rita Tavares**, “Ritinha”, a qual nem precisa de descrição. Sabes o quanto te adoro. Inspiras-me a ser uma pessoa melhor, e sempre estiveste lá para mim, como eu estarei sempre para ti.

À **Professora Doutora Margarida Moncada**, sempre disponível para me ajudar.

À **Professora Doutora Alexandra Bernardo**, pela sua exigência e, ao mesmo tempo, compreensão e colaboração.

À **Professora Doutora Filipa Alves da Costa**, pela sua simpatia e humor, e por sempre ter puxado por mim.

À **Professora Doutora Deolinda Auxtero**, por ser, essencialmente, uma boa amiga para os seus alunos. Pela sua exigência e empatia.

Ao **Professor Doutor José Martins dos Santos**, pelo excelente professor que foi, e por tanto ter honrado a nossa *Muy Nobre Academia*. Preservará para sempre nas nossas memórias.





## Resumo

A infecção pelo HIV-1 é atualmente considerada uma das doenças mais preocupantes e investigadas em todo o mundo. Desde o seu aparecimento, estudos exaustivos têm vindo a ser realizados, de modo a controlar a epidemia, que tem vindo a causar milhares de mortos em todo o Mundo. Deste modo, a investigação científica tem surtido enormes avanços, sendo que, atualmente, é possível diminuir a sua carga viral até níveis indetetáveis através da terapêutica antirretroviral, impedindo assim a sua capacidade de deteriorar o sistema imunitário, permitindo aos indivíduos infetados viver com a infecção.

Porém, não há ainda uma vacina contra o HIV, e as taxas de prevalência e de incidência continuam bastante elevadas, pelo que a **cura** da doença é uma hipótese em investigação. Existem dois tipos de cura: **cura funcional** e **cura efetiva**.

Várias estratégias têm vindo a ser desenvolvidas e melhoradas, incluindo o tratamento muito precoce e agressivo, vacinas terapêuticas, imunoterapêutica e “block-and-lock” para a cura funcional e, para a cura efetiva, a edição genómica, terapia genética e “shock-and-kill”. Todas elas têm grande potencial, sendo o maior obstáculo da cura os **reservatórios virais**. Até hoje, em apenas alguns casos foi observada uma cura funcional temporária e, apenas num único caso se atingiu a cura efetiva. Por esse motivo, tem-se vindo a estudar intensivamente as características dos reservatórios virais, os locais onde estes se armazenam, e de que modo estes podem ser erradicados, ou permanecer inativos sem necessidade de recorrer a terapêutica.

**Palavras-chave:** HIV, cura, reservatórios, TARV.



## **Abstract**

The HIV-1 infection is considered one of the most worrying and currently investigated diseases. Since its inception, exhaustive studies have been carried out in order to control the epidemic, which has caused thousands of deaths worldwide. Thus, scientific research has made enormous strides, and it is now possible to reduce the loads to undetectable levels through antiretroviral therapy, thereby impeding its ability to impair the immune system, allowing infected individuals to live with the infection.

However, there is still no vaccine against HIV, and prevalence and incidence rates remain high, so cure of the disease is a hypothesis under investigation. There are two types of cure: functional cure and sterilizing cure.

Several strategies have been developed and improved, including very early and aggressive treatment, therapeutic vaccines, immunotherapy and “block-and-lock” for a functional cure, and gene editing, gene therapy and “shock-and-kill” for a sterilizing cure. All of them have great potential, being reservoirs the major obstacle for cure. To date, in only a few cases a functional cure has been observed and a sterilizing cure has been achieved in only one case. For this reason, the characteristics of viral reservoirs, the places where they are stored, and the way in which they can be eradicated, or remain inactive without the need for therapeutic treatment, have been intensively studied.

**Keywords:** HIV; cure; reservoirs; ART.



## Índice Geral

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Introdução .....</b>   | <b>11</b> |
| <b>1.1. Caraterização do HIV .....</b>   | <b>11</b> |
| 1.1.1. Tipos de vírus e suas origens .....   | 11        |
| 1.1.2. Ciclo de vida do HIV .....  | 11        |
| <b>2. Epidemiologia da infeção por HIV .....</b>   | <b>13</b> |
| <b>2.1. Modo de transmissão .....</b>  | <b>13</b> |
| <b>2.2. Taxas de Prevalência e Incidência Global.....</b>                                | <b>20</b> |
| <b>3. História natural da infeção .....</b>  | <b>21</b> |
| <b>3.1. Infeção aguda .....</b>  | <b>22</b> |
| <b>3.2. Infeção crónica .....</b>  | <b>22</b> |
| 3.2.1. Fase latente (ou assintomática).....  | 22        |
| 3.2.2. Fase sintomática inicial .....  | 23        |
| 3.2.3. SIDA .....  | 23        |
| <b>3.3. Definição de reservatório viral .....</b>  | <b>24</b> |
| <b>4. Terapêutica Antirretroviral.....</b>   | <b>27</b> |
| <b>4.1. TARV .....</b>   | <b>27</b> |
| <b>4.2. Imunoterapêutica com anticorpos amplamente neutralizantes (bnAbs) .....</b>      | <b>28</b> |
| <b>4.3. Imunoterapêutica com um inibidor de “check-point” .....</b>                      | <b>32</b> |
| <b>4.4. Impacto da terapêutica (e da sua interrupção) nos reservatórios virais .....</b> | <b>33</b> |
| <b>5. Cura da infeção por HIV .....</b>  | <b>35</b> |
| <b>5.1. Definição de cura efetiva e cura funcional .....</b>                             | <b>35</b> |
| <b>5.2. Justificação da necessidade de curar os doentes com HIV .....</b>                | <b>35</b> |
| <b>5.3. Caracterização da cura efectiva do “paciente de Berlim” .....</b>                | <b>36</b> |
| <b>5.4. Caracterização de alguns casos de cura funcional .....</b>                       | <b>37</b> |
| 5.4.1. Criança de Mississippi.....   | 39        |
| 5.4.2. Controladores Pós-tratamento (Estudo VISCONTI).....                               | 39        |
| 5.4.3. Pacientes de Boston .....   | 39        |
| <b>5.5. Revisão das estratégias de cura efectiva e cura funcional em curso .....</b>     | <b>41</b> |
| 5.5.1. Estratégias de cura funcional .....   | 41        |
| 5.5.2. Estratégias de cura efetiva .....   | 42        |
| <b>5.6. Ensaios clínicos em curso na investigação de uma cura .....</b>                  | <b>53</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>6. Considerações éticas e sociais .....</b> | <b>54</b> |
| <b>7. Conclusão .....</b>                      | <b>57</b> |
| <b>8. Bibliografia.....</b>                    | <b>59</b> |

## Índice de Figuras

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> - Partícula de HIV.....  | 11 |
| <b>Figura 2</b> - Ciclo de vida do HIV.....  | 12 |
| <b>Figura 8</b> - Imagens microscópicas dos diferentes tipos de epitélio: epitélio retal ( <b>A</b> ), epitélio vaginal ( <b>B</b> ) e epitélio do cérvix uterino ( <b>C</b> ) .....   | 13 |
| <b>Figura 3</b> - Constituição do trato genital feminino.. .....   | 16 |
| <b>Figura 4</b> - Epitélio endocervical .....  | 16 |
| <b>Figura 5</b> - Processo de infecção por sinapses virológicas. ....  | 17 |
| <b>Figura 6</b> - Fatores que afetam a infecção por HIV no trato genital masculino. ( <b>A</b> ) – Constituintes do pénis. ( <b>B</b> ) – Desencadeamento da resposta inflamatória pela presença de populações microbiais. ( <b>C</b> ) – Representação do processo de transmissão do HIV através do epitélio estratificado do prepúcio, que consiste em seis camadas dérmicas.....                                | 19 |
| <b>Figura 10</b> - Evolução da incidência de HIV em Portugal, 2017.....  | 21 |
| <b>Figura 9</b> - Evolução da prevalência de HIV em Portugal, 2017.....  | 21 |
| <b>Figura 11</b> - Decurso natural da infecção por HIV .....   | 21 |
| <b>Figura 16</b> - Reservatório viral .....  | 24 |
| <b>Figura 19</b> – Cinética de três tipos de reservatórios virais em 7 doentes tratados numa fase inicial da infecção.....   | 25 |
| <b>Figura 21</b> - Sinapse virológica no cérebro, entre uma célula H9 e um astrócito.....  | 26 |
| <b>Figura 17</b> - Locais anatómicos para os quais os reservatórios virais se disseminam ....  | 27 |
| <b>Figura 12</b> - Espícula presente na superfície do HIV, mostrando locais onde os bnAbs se ligam .....   | 29 |
| <b>Figura 13</b> - Descrição esquemática do estudo anterior, que consiste na administração subcutânea de TARV combinada em macacos rhesus infetados.....   | 31 |
| <b>Figura 14</b> - Cargas virais resultantes após descontinuação da TARV.....  | 31 |
| <b>Figura 15</b> - Terapia de transferência genética mediada por um vetor. Após uma única injeção intramuscular, o DNA recombinante encapsidado do vírus associado ao adenovírus (rAAV) é transduzido para as células musculares, formando um episoma no interior do núcleo do hospedeiro. Este episoma conduz à expressão dos genes codificadores dos bnAbs, que são secretados para a circulação sanguínea. .... | 32 |
| <b>Figura 18</b> - TARV prolongada iniciada na infecção primária do HIV-1. Trajetórias das contagens dos níveis de linfócitos T-CD4+ ( <b>A</b> ), e razão CD4+/CD8+ ( <b>B</b> ), em pacientes  |    |

|  |    |
|--|----|
| com início de tratamento na fase primária (TFP) vs. Tratamento na fase crónica (TFC) da infecção.....  | 33 |
| <b>Figura 20</b> - Efeito do tempo entre a infecção por HIV e o início da TARV sobre o tamanho dos reservatórios e a duração da remissão viral. Linfócitos T-CD4+ (verde); HIV (amarelo); linfócitos T-CD4+ produtivamente infectados (rosa); linfócitos T-CD4+ infectados em estado latente (azul); linfócitos T-CD4+ reativados (magenta)..... | 34 |
| <b>Figura 22</b> - Evolução do estudo-coorte realizado pela ANRS com 173 crianças infectadas por HIV.....  | 38 |
| <b>Figura 23</b> - Tempo decorrido entre a interrupção da TARV e a reativação da carga viral, nos pacientes de Boston.....   | 40 |
| <b>Figura 24</b> – Tempo decorrente entre os diferentes casos de cura até uma reativação da carga viral, após interrupção da TARV .....  | 40 |
| <b>Figura 25</b> - Efeito da TARV precoce sobre a dimensão dos reservatórios virais.....   | 41 |
| <b>Figura 26</b> - Média dos níveis de acetilação da histona H3, medidos através da citometria de fluxo em linfócitos.....   | 43 |
| <b>Figura 27</b> - Estratégia "Block-and-Lock" para a cura funcional do HIV-1.....   | 48 |
| <b>Figura 28</b> - Elemento de resposta de transativação (TAR). .....  | 48 |
| <b>Figura 29</b> – Estratégia de terapia genética para erradicação dos provirus de HIV de células latentes através de ZFN, TALENs ou CRISPR.....   | 49 |
| <b>Figura 30</b> - Mecanismos de reparação de DNA induzidos por nucleases .....  | 50 |
| <b>Figura 31</b> – Estratégia de terapia genética para prevenir a infecção por HIV em células suscetíveis.....   | 52 |



## **Índice de Tabelas**

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1</b> - Probabilidade estimada de aquisição de HIV entre as diferentes formas de exposição. .... | 15 |
| <b>Tabela 2</b> - Prevalência e incidência do HIV em Portugal e noutras regiões do Mundo, em 2017 .....    | 20 |
| <b>Tabela 3</b> – Recomendações terapêuticas da IAS .....  | 28 |
| <b>Tabela 4</b> - Fármacos iHDAC .....   | 44 |
| <b>Tabela 5</b> - RVDs específicos para os diferentes nucleótidos.....                                     | 51 |
| <b>Tabela 6</b> – Ensaio clínico em curso .....  | 53 |

## **Lista de Abreviaturas**

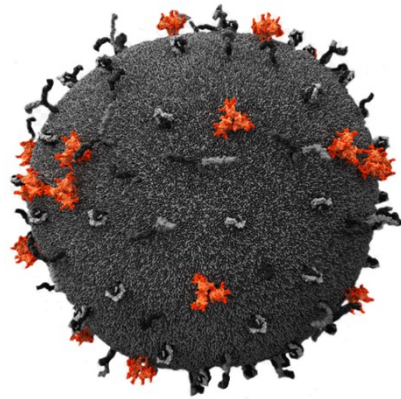
**BHE** – Barreira hematoencefálica  
**bnAbs** – Anticorpos monoclonais amplamente neutralizantes  
**CMV** – Vetor de citomegalovírus  
**DNA** – Ácido desoxirribonucleico  
**DNAH** – Disfunção neurocognitiva associada ao HIV  
**dCA** – dideidro-cortistatina A  
**DST** – Doença sexualmente transmissível  
**HDR** – Reparação causada por homologia  
**HIV** – Vírus da imunodeficiência humana  
**IAS** – *International AIDS Society*  
**iHDAC** – inibidor da histona deacetilase  
**IUPM** – Unidades infecciosas por milhão de células  
**LRA** – Agentes de reversão de latência  
**NHEJ** – Junção de duas extremidades não homólogas  
**nnAbs** – Anticorpos monoclonais não neutralizantes  
**PAM** – *Protospacer-adjacent motif*  
**rAAV** – Vírus associado ao adenovírus recombinante  
**RER** – Retículo endoplasmático rugoso  
**RNA** – Ácido ribonucleico  
**RTA** – Resposta de transativação  
**RVD** – Diresíduos de repetição variável  
**SHIV** – Vírus da imunodeficiência símia  
**SIDA** – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida  
**TAF** – Tenofovir alafenamida  
**TCH** – Transplante alogénico de células hematopoiéticas  
**Tfh** – Linfócito T *helper*  
**TGF** – Trato genital feminino  
**TGM** – Trato genital masculino

## 1. Introdução

### 1.1. Caracterização do HIV

#### 1.1.1. Tipos de vírus e suas origens

O HIV-1 (Vírus da Imunodeficiência Humana) foi isolado pela primeira vez em 1983. O segundo tipo de vírus, o HIV-2, foi isolado em 1986. O HIV-1 contém os grupos M, N, O e P (Peeters, Jung, & Ayoub, 2013), e o HIV-2 os grupos A a I (Visseaux, Damond, Matheron, Descamps, & Charpentier, 2016). Os dois tipos de vírus tiveram a sua origem no SIV, vírus existentes em macacos, que foram transmitidos ao Homem em múltiplas ocasiões no início do século XX e nele evoluíram durante décadas até se tornarem



**Figura 1** - Partícula de HIV.  
Adaptado de (Stefanov & Voronin, 2010).

nos vírus HIV e causarem a epidemia que começou no início dos anos 80. O HIV-1 do grupo M foi o único responsável pela pandemia global (Bahcall, 2014). Dentro do grupo M, estão compreendidos inúmeros subtipos virais geneticamente distintos (Faria et al., 2014). Existem ainda inúmeros recombinantes constituídos pelos diferentes subtipos.

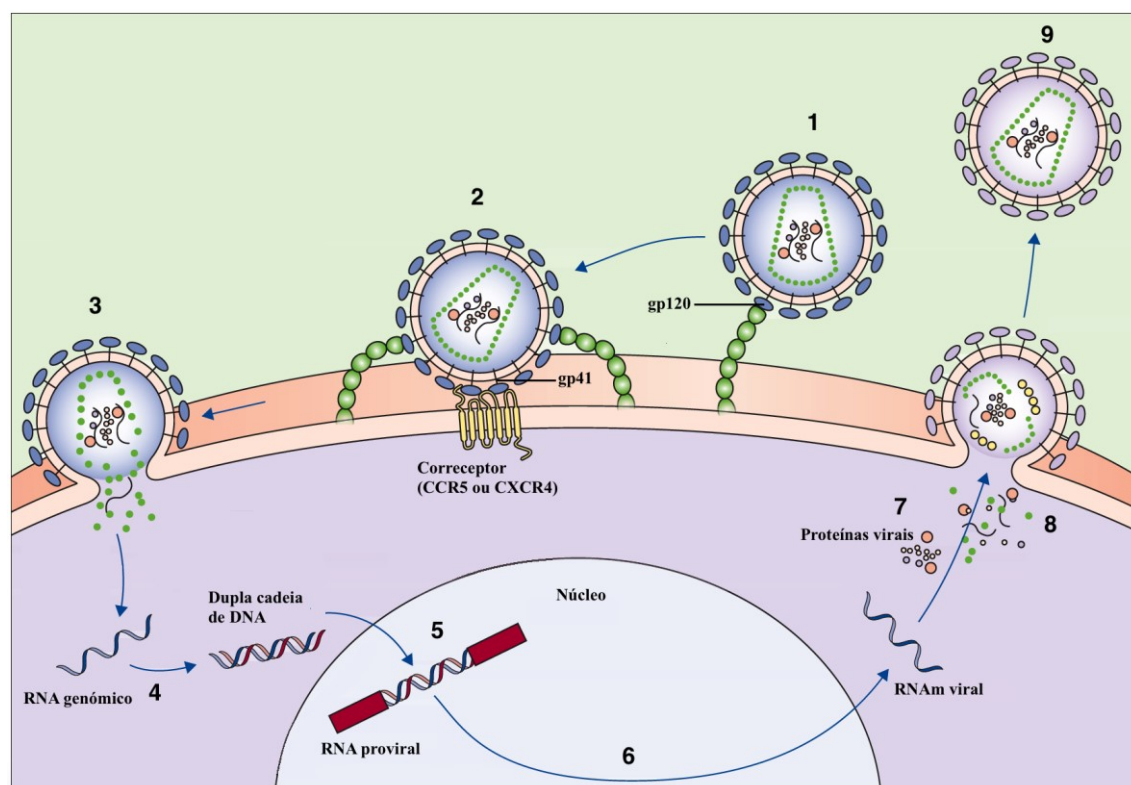
#### 1.1.2. Ciclo de vida do HIV

O ciclo de vida do HIV inicia-se com a ligação da glicoproteína gp120 presente no invólucro da partícula viral aos recetores da membrana de um linfócito T-CD4<sup>+</sup> do hospedeiro (1), criando uma alteração conformacional que permite uma posterior ligação aos coreceptores CCR5 e/ou CXCR4, exposição do péptido de fusão na gp41 (2) e subsequente fusão do invólucro viral com a membrana citoplasmática (Lee, 2015; Maartens, Celum, & Lewin, 2014). A cápside viral entra na célula, sendo decomposta e libertando, assim, enzimas e RNA viral para o citoplasma (3). A transcriptase reversa converte o RNA viral em DNA (DNA proviral) (4), que é então transportado para o núcleo, local onde é integrado no genoma da célula hospedeira, pela ação da enzima integrase (5) (Jagarapu, Cannon, & Zurakowski, 2017; Kurapati, Samikkannu, Atluri, &

Nair, 2015). O DNA proviral é transcrito (6), dando origem a cadeias de RNAm, que migram para o citoplasma onde são traduzidas (7), sintetizando assim componentes importantes no desenvolvimento da célula viral, como os precursores das poliproteínas Gag (Pr55<sub>Gag</sub>) e GagPol, as glicoproteínas da cápside viral, as proteínas acessórias e as proteínas reguladoras virais (Freed, 2015; Jagarapu et al., 2017)

Dá-se a migração dos precursores da Gag e GagPol e das glicoproteínas da cápside viral até à membrana plasmática. O transporte das glicoproteínas do invólucro viral é realizado através da via secretora, tendo início no retículo endoplasmático rugoso (RER), passando para o complexo de Golgi, e, daí, para a membrana citoplasmática (Freed, 2015).

A protease viral é responsável por clivar as proteínas precursoras (Gag e GagPol) em pontos específicos (8), dando origem a proteínas individuais de menor dimensão, possibilitando assim a formação e organização de duas cadeias de RNA, cápside e proteínas enzimáticas, tornando a célula viral madura e com capacidade para infetar novas células T-CD4 (9) (Guangdi & Clercq, 2016; van Hijum, Medema, & Kuipers, 2009).



**Figura 2** - Ciclo de vida do HIV. Adaptado de (Maartens et al., 2014).

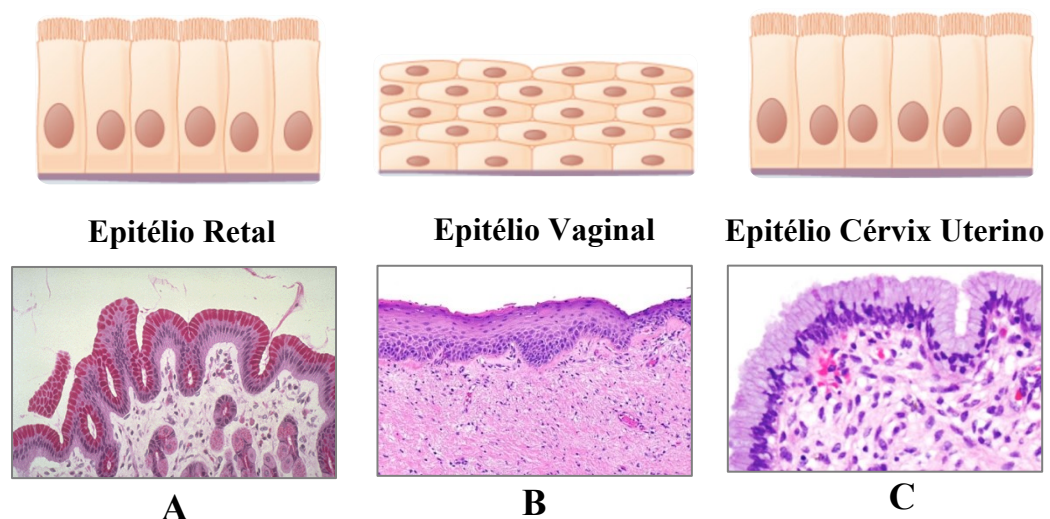
## 2. Epidemiologia da infecção por HIV

### 2.1. Modo de transmissão

Num indivíduo infetado, o HIV encontra-se presente no sangue, secreções genitais, saliva, lágrimas e leite materno. A sua transmissão pode ocorrer de três diferentes modos:

- Relações sexuais;
- Contato com sangue contaminado;
- Transmissão vertical, amamentação ou durante o parto (“UNIT 5 VARIOUS MODES OF TRANSMISSION OF HIV,” n.d.).

Numa relação sexual, as diferentes vias através das quais pode ocorrer transmissão (colo do útero, vagina, pénis ou reto) estão naturalmente protegidas por barreiras epiteliais e mucosas que têm na sua constituição células do sistema imunitário e componentes antimicrobiais que conferem resistência à infecção viral (Burgener, McGowan, & R Klatt, 2015; Coutinho, Sarmento, & das Neves, 2017).



**Figura 3** - Imagens microscópicas dos diferentes tipos de epitélio: epitélio retal (A), epitélio vaginal (B) e epitélio do cérvix uterino (C).

No processo de transmissão por via sexual, os vírus presentes nas secreções mucosas de um indivíduo infetado ligam-se às células-alvo presentes no muco do parceiro saudável (linfócitos T-CD4<sup>+</sup> ou macrófagos) alcançando posteriormente a barreira epitelial (Burgener et al., 2015; Coutinho et al., 2017), a qual poderão atravessar de diferentes modos: infetando linfócitos T-CD4<sup>+</sup> ou outros leucócitos, ligando-se a células Langerhans que as capturam, auxiliando o seu transporte até à camada subepitelial sem ocorrer infeção, atravessando fendas que poderão eventualmente estar presentes no epitélio do indivíduo não infetado ou por translocação direta através do epitélio (Coutinho et al., 2017).

Ao alcançarem o subepitélio, os vírus dirigem-se às suas células-alvo, podendo estas ser células dendríticas, linfócitos T-CD4<sup>+</sup> ou macrófagos, sendo os linfócitos T-CD4<sup>+</sup> os alvos prioritários na disseminação viral (Sattentau & Stevenson, 2016).

A transmissão de HIV através da mucosa retal é relativamente mais fácil e frequente do que por outras vias, estimando-se que cerca de 70% das infeções ocorrem entre homossexuais por esta via. Certas diferenças significativas entre a mucosa vaginal e a mucosa rectal explicam a maior suscetibilidade de infeção por HIV através da mucosa rectal:

- O epitélio colunar simples do reto é mais suscetível a traumas ou fendas durante a relação sexual do que a vagina ou pénis;
- O trato gastrointestinal é colonizado por linfócitos T-CD4<sup>+</sup>, sendo estes muitas vezes os primeiros alvos do HIV;
- A seção mais distal do reto possui grandes concentrações de macrófagos que expressam o recetor CCR5 (Kelley et al., 2017).

Relativamente à relação heterossexual, verifica-se que a vaginal recetiva tem maiores taxas de transmissão do que a vaginal insertiva, o que significa que a mulher é mais susceptível à transmissão do HIV do que o homem.

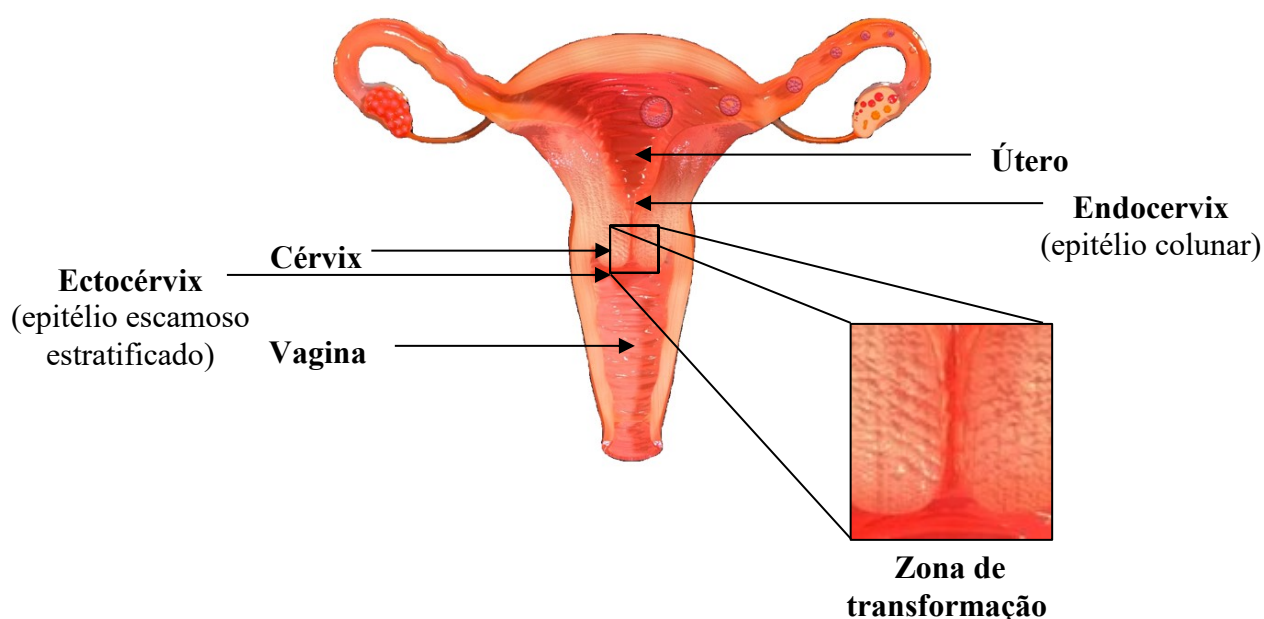
**Tabela 1** - Probabilidade estimada de aquisição de HIV entre as diferentes formas de exposição.  
Adaptado de (Patel et al., 2014).

| <b>Modo de Transmissão</b>               | <b>Risco por cada 10.000 exposições</b> |
|--|---|
| <b>Exposição parentérica</b>             |   |
| Transfusão de sangue                     | 9250                                    |
| Partilha de seringas (injeção de drogas) | 63                                      |
| Seringas percutâneas                     | 23                                      |
| <b>Exposição sexual</b>                  |   |
| Sexo anal recetivo                       | 138                                     |
| Sexo anal insertivo                      | 11                                      |
| Sexo vaginal recetivo                    | 8                                       |
| Sexo vaginal insertivo                   | 4                                       |
| Sexo oral recetivo                       | Baixo                                   |
| Sexo oral insertivo                      | Baixo                                   |
| <b>Transmissão vertical</b>              |   |
| Transmissão mãe para filho               | 2260                                    |

Neste contexto é interessante notar que mulheres seronegativas altamente expostas ao HIV-1 podem ser resistentes ao HIV-1 devido à presença de quantidades elevadas de imunoglobulina A específica contra HIV-1 no lavado genital, bem como quantidades elevadas de linfócitos T (CD3+, CD4+ e CD8+) no trato vaginal, conferindo-lhes resistência ao vírus (Yao et al., 2014).

O trato genital feminino (TGF) divide-se em (Figura 4):

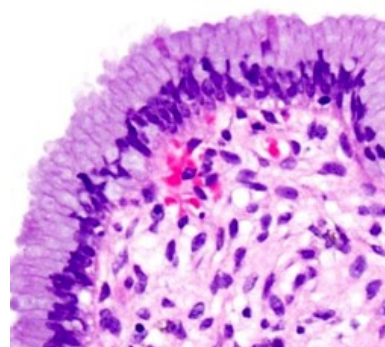
- TGF superior – vagina e ectocervix;
- TGF inferior – endocervix, útero, trompas de Falópio e ovários (Vitali, Wessels, & Kaushic, 2017).



**Figura 4** - Constituição do trato genital feminino. Retirado de <https://globalpublishers.co.tz/kuchelewa-kuzaa-kunavyosababisha>.

Durante a fase de alta secreção de progesterona do ciclo menstrual, por exemplo, a atividade dos linfócitos T citotóxicos (CD8+) e das células “natural killer” (NK) encontra-se suprimida para que haja o desenvolvimento de um ambiente propício à implantação embrionária. Simultaneamente, o risco de aquisição de doenças sexualmente transmissíveis (DST) aumenta e a mulher torna-se mais vulnerável à transmissão do HIV (Vitali et al., 2017).

Os locais onde a transmissão do HIV-1 é mais propícia são o endocervix e a zona de transformação – zona em que há alteração do epitélio colunar para estratificado –, os quais são constituídos por epitélio colunar. Tal como no reto, este epitélio tem apenas uma camada de células com a fina espessura de 10 a 30  $\mu\text{m}$ , permitindo um fácil acesso do vírus às células intraepiteliais e da submucosa. Esta é também a zona do TGF com maior abundância de linfócitos T-CD4+ e macrófagos (Vitali et al., 2017).



**Figura 5** - Epitélio endocervical. Adaptado de (“The columnar epithelium of the endocervix,” 2014).

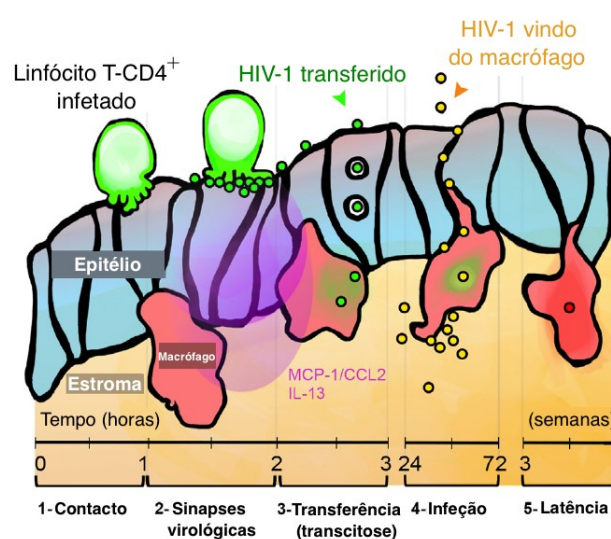


No caso do Homem, a uretra é um local bastante propenso à infecção inicial por parte de diversos vírus e bactérias, sendo considerada acessível à invasão de microrganismos patogénicos durante uma relação sexual. A mucosa da uretra tem uma fina camada de células epiteliais e tem os principais alvos do HIV-1, os linfócitos T-CD4<sup>+</sup> e macrófagos, salientando a hipótese da uretra masculina ser uma zona mais suscetível à entrada do HIV-1 (Real, Sennepin, Ganor, Schmitt, & Bomsel, 2018).

Ao atravessar o muco que reveste o epitélio da mucosa uretral, o vírus alcança o tecido epitelial, local onde se encontram os macrófagos, que, por sua vez, o transportam até ao compartimento dérmico. Contrariamente ao epitélio vaginal, o epitélio uretral não possui células Langerhans, daí os macrófagos permitirem a passagem transepitelial dos vírus. Através de estudos bioquímicos e observação microscópica de células fixadas, verificou-se que, por outro lado, quando as células infetadas pelo HIV-1 entram em contacto com um epitélio monoestratificado, é potenciado o transporte das partículas virais através das células epiteliais até ao interior do estroma, sem necessidade de infetar células ao longo do epitélio. É no estroma que os vírus infetam as células-alvo – por exemplo, macrófagos. Este tipo de transporte é realizado por “sinapses virológicas”. (Real et al., 2018).

As sinapses virológicas consistem, de um modo geral, em zonas de contacto polarizadas, através das quais há transferência de partículas virais entre uma célula infetada e outra não infetada. Este processo consiste nos passos seguintes (Figura 6):

- 1 – O linfócito T-CD4<sup>+</sup> entra em contacto com o epitélio;
- 2 – Os linfócitos T-CD4<sup>+</sup> transferem os vírus localmente, através das sinapses virológicas;
- 3 – Dá-se a transcitose dos vírus, atravessando as células epiteliais;
- 4 – Os vírus atingem eficientemente os macrófagos, num ambiente em que as citocinas quimioatratoras dos mesmos, MCP-1/CCL2 e IL-13, potenciam esta ligação;

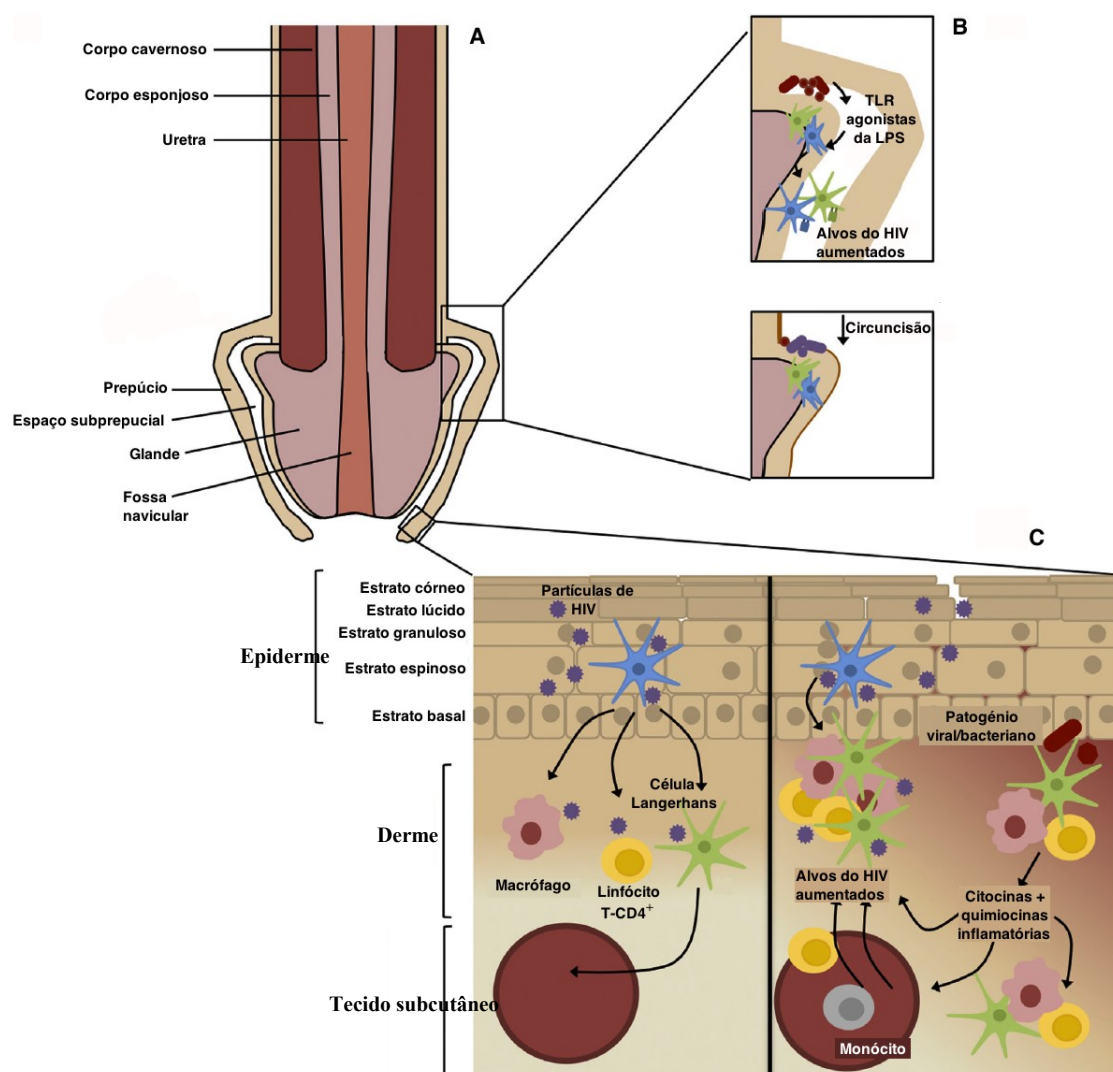


**Figura 6** - Processo de infecção por sinapses virológicas (Real et al., 2018).

**5** – A produção viral por parte dos macrófagos vai diminuindo até ser atingido o estado de latência (Real et al., 2018).

O trato genital masculino é constituído pelo pénis, uretra e testículos. O prepúcio, considerado uma proteção física e imunológica da glândula, consiste numa dupla camada de epitélio estratificado que contém queratinócitos escamosos, formando uma cobertura protetora. A circuncisão consiste na remoção de quase todo o epitélio do prepúcio, deixando exposta uma superfície queratinizada que se considera ser resistente à infeção pelo HIV. As populações microbianas não associadas a infeções sexualmente transmissíveis modulam a resposta inflamatória genital pelo reconhecimento de antígenos, que pode resultar na ativação ou migração das células-alvo do HIV (macrófagos, linfócitos T-CD4+ e células dendríticas) até ao prepúcio. Com a circuncisão, o espaço húmido existente sob o prepúcio é removido, reduzindo assim a existência de bactérias anaeróbias, normalmente pro-inflamatórias (Esra et al., 2016).

No processo de transmissão viral por esta via, as partículas de HIV atravessam as bordas epiteliais queratinizadas através de pequenos abrasões durante o contato sexual ou de sinapses virais entre as células infetadas e as células epiteliais. As células Langerhans, presentes na epiderme, são as primeiras a entrar em contato com os vírus, ficando ativas, e migram até à derme, transferindo-os para os macrófagos, linfócitos ou células dendríticas (Esra et al., 2016; Sattentau & Stevenson, 2016).



**Figura 7** - Fatores que afetam a infecção por HIV no trato genital masculino. (A) – Constituintes do pênis. (B) – Desencadeamento da resposta inflamatória pela presença de populações microbianas. (C) – Representação do processo de transmissão do HIV através do epitélio estratificado do prepúcio, que consiste em seis camadas dérmicas. Adaptado de (Esra et al., 2016).

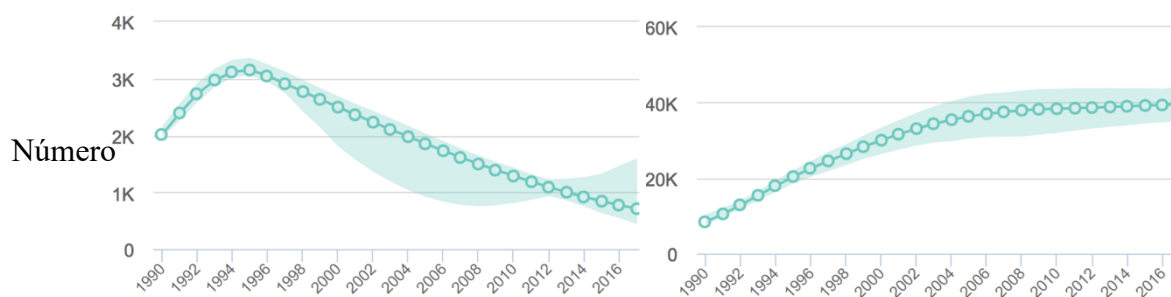
## 2.2. Taxas de Prevalência e Incidência Global

Em 2017, a prevalência e incidência de casos de infeção por HIV salientaram-se na África Ocidental e Meridional, com valores de **68** e **1,88** novos casos por cada 1.000 habitantes, respetivamente, enquanto que, contrariamente, no Médio Oriente e Norte de África foram registados os valores mais baixos, de **< 1** e **0,05** por cada 1.000 habitantes, respetivamente. Em relação a Portugal, a prevalência foi de aproximadamente **6** e, a incidência, de **0,07** novos casos por cada 1.000 habitantes.

Apesar das diferenças dos valores de incidência entre as várias regiões do Mundo, ainda assim continuam bastante elevados, de um modo geral, não obstante o tratamento e diagnóstico precoces.

**Tabela 2** - Prevalência e incidência do HIV em Portugal e noutras regiões do Mundo, em 2017. Adaptado de <http://aidsinfo.unaids.org>.

|  | Prevalência<br>(nº de casos) | Nº de casos<br>por cada<br>1.000<br>habitantes | Incidência<br>(nº de novos<br>casos) | Novos casos<br>por cada<br>1.000<br>habitantes |
|--|------------------------------|--|--------------------------------------|--|
| <b>Portugal</b>                                  | <b>40.000</b>                | <b>6</b>                                       | <b>&lt; 1000</b>                     | <b>0,07</b>                                    |
| África Oriental e Meridional                     | 19.600.000                   | <b>68</b>                                      | 800.000                              | <b>1,88</b>                                    |
| África Ocidental e Central                       | 6.100.000                    | 19   | 370.000                              | 0,75   |
| Ásia e Pacífico                                  | 5.200.000                    | 2  | 280.000                              | 0,07   |
| Europa Oriental e Ásia<br>Central                | 1.400.000                    | 8  | 130.000                              | 0,45   |
| América Latina                                   | 1.800.000                    | 5  | 100.000                              | 0,17   |
| Caraíbas   | 310.000                      | 12   | 15.000                               | 0,39   |
| Médio Oriente e Norte de<br>África               | 220.000                      | < 1  | 18.000                               | <b>0,05</b>                                    |
| Europa Ocidental e Central<br>e América do Norte | 2.200.000                    | 3  | 70.000                               | 0,07   |
| Global   | <b>36 900 000</b>            | <b>8</b>                                       | <b>1.800.000</b>                     | <b>0,25</b>                                    |



**Figura 8** - Evolução da incidência de HIV em Portugal, 2017

**Figura 9** - Evolução da prevalência de HIV em Portugal, 2017

### 3. História natural da infeção

Na infeção sem tratamento pelo HIV decorre em várias fases: fase aguda, fase crónica, que é gerível com fármacos, e, finalmente, SIDA.



**Figura 10** - Decurso natural da infeção por HIV. Adaptado de (Galvis & Vegas, 2015).

### **3.1. Infecção aguda**

Infecção aguda é o período que decorre durante as primeiras 2 a 3 semanas após a transmissão, no qual se dá a rápida replicação do HIV em numerosas quantidades em direção aos diferentes tecidos e órgãos (Gorenec et al., 2016), sendo atingidas cargas virais extremamente elevadas, tornando os indivíduos infetados altamente infecciosos (Rutstein et al., 2016), e o HIV rapidamente detetável no plasma pela amplificação do RNA viral ou pela deteção da proteína p24 (Melhuish & Lewthwaite, 2018). Ocorre, simultaneamente, uma diminuição do número de linfócitos T-CD4+ (Gorenec et al., 2016) e o início da formação de reservatórios virais (“HIV ‘reservoirs’ may form earlier than expected,” 2014).

Nesta fase, manifestam-se habitualmente sintomas como febre, dores de cabeça, mal-estar, frequência cardíaca elevada e linfadenopatias, os quais surgem no pico da virémia (> 1 milhão de cópias/mL), mas têm uma curta duração (Robb & Ananworanich, 2016).

Aproximadamente 4 a 6 semanas após a infecção, os anticorpos anti-HIV tornam-se também detetáveis, sendo que, habitualmente, a seroconversão ocorre após 3 semanas a 1 mês e, em casos mais raros, até 6 meses (Melhuish & Lewthwaite, 2018).

### **3.2. Infecção crónica**

#### **3.2.1. Fase latente (ou assintomática)**

Nesta fase, após o sistema imunitário ser ativado, os níveis de linfócitos T-CD4+ geralmente aumentam, mantendo-se, porém, abaixo dos valores normais. O HIV-1 progride para um estado de latência, o qual se caracteriza geralmente por baixos níveis de carga viral no sangue, podendo durar desde alguns meses até vários anos (Gorenec et al., 2016; Melhuish & Lewthwaite, 2018; Menezes et al., 2015), período em que o indivíduo infetado não manifesta sintomas ou manifestações clínicas relevantes, daí poder ser denominada como uma fase “assintomática”.

### **3.2.2. Fase sintomática inicial**

Segue-se, posteriormente, a fase sintomática inicial, na qual a contagem de linfócitos T-CD4<sup>+</sup> decresce, correspondendo a uma diminuição da atividade do sistema imunitário e, conseqüentemente, a uma maior suscetibilidade a infeções oportunistas. (Menezes et al., 2015)

### **3.2.3. SIDA**

É a fase em que o sistema se encontra mais debilitado, estando associada a um aumento da replicação viral e, simultaneamente, a um declínio dos níveis de linfócitos T-CD4<sup>+</sup> até  $< 200/\text{mm}^3$ . O tempo necessário para o diagnóstico de SIDA num indivíduo infetado após a seroconversão pode ser de 2 anos, ou até mais de 15 anos. (Galvis & Vegas, 2015). Com a diminuição dos níveis de linfócitos T-CD4<sup>+</sup>, o sistema imunitário torna-se menos eficiente e, conseqüentemente, o organismo fica mais suscetível a infeções oportunistas.

Algumas das infeções mais frequentes incluem:

- Candidíase oral
- Herpes zóster
- Tuberculose pulmonar
- Pneumonia bacteriana
- Toxoplasmose (Alemayehu, Yisehak, Alaro, & Alemayehu, 2017)

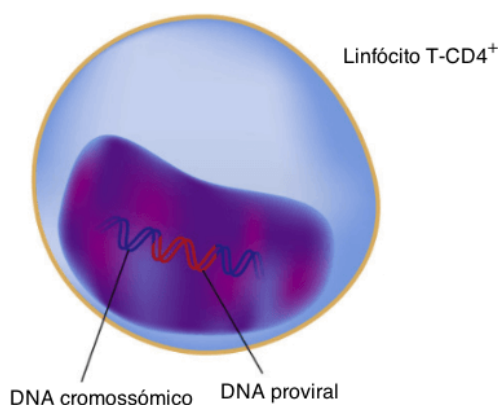
Para além de infeções oportunistas, os doentes ficam também mais suscetíveis a certos tipos de cancro, realçando-se o sarcoma de Kaposi e o linfoma não-Hodgkin (Tanaka et al., 2018).

### **3.3. Definição de reservatório viral**

Os reservatórios virais são linfócitos T-CD4<sup>+</sup> (células de memória) com infeção por HIV-1 latente, as quais integram DNA proviral, com um tempo de semi-vida de aproximadamente 44 meses (Brodin et al., 2016).

Os linfócitos T-CD4<sup>+</sup> ativados, ao serem infetados pelas partículas virais do HIV, voltam para o seu estado de memória de repouso, como parte do seu processo normal após combate dos antígenos, estabelecendo assim um reservatório latente (RL). (Bruner, Hosmane, & Siliciano, 2015)

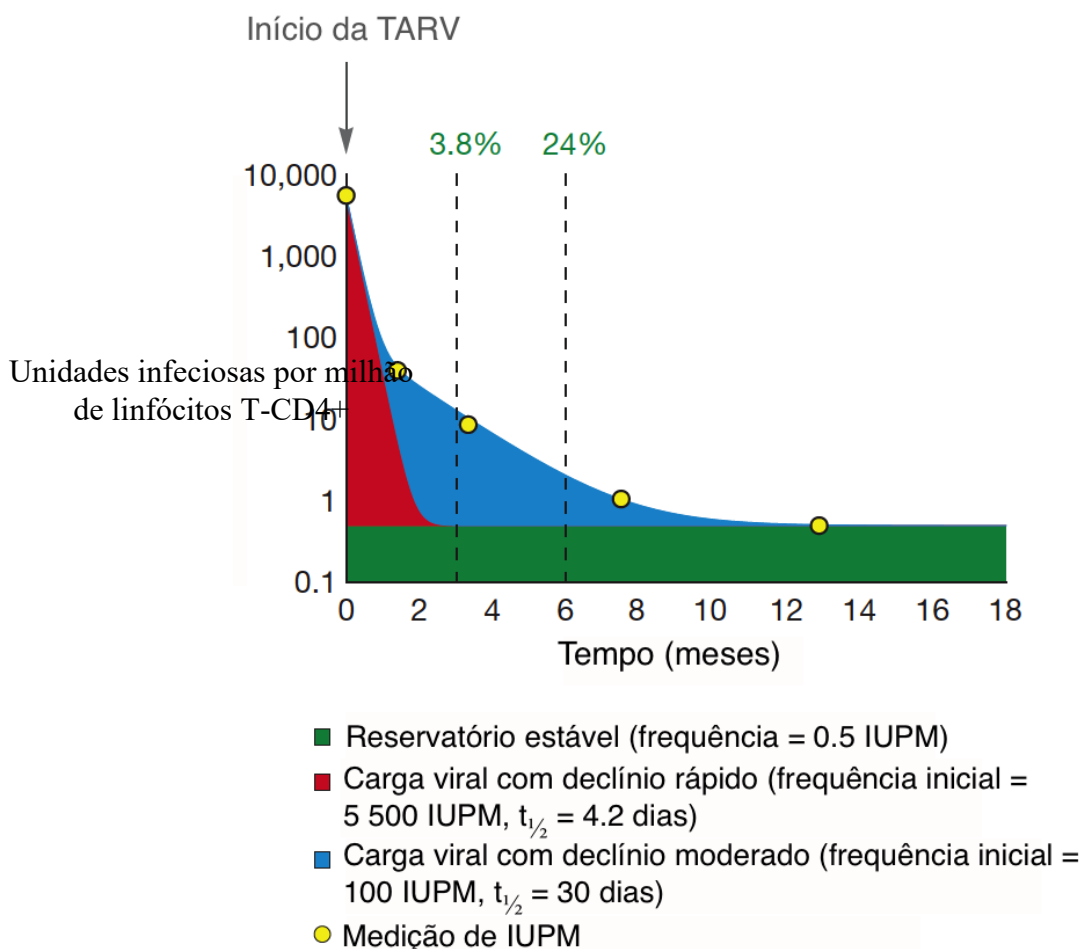
Num RL, a expressão viral torna-se inviável, sendo que o genoma viral se integra e permanece no DNA como provírus, mas não é transcrito, não sendo, por este motivo, alvo do sistema imunitário ou da terapêutica antirretroviral.



**Figura 11** - Reservatório viral. Retirado de:  
<https://labiotech.eu/medical/abivax-hiv-cure-viral-reservoir/>

De modo a explorar as taxas de declínio, bem como a estabilidade dos reservatórios de HIV, foi realizado um estudo de coorte com 7 doentes tratados numa fase inicial da infeção (Rosenbloom, Hill, Laskey, & Siliciano, 2017). Os resultados estão descritos na Figura 12:





**Figura 12** – Cinética de três tipos de reservatórios virais em 7 doentes tratados numa fase inicial da infeção. Adaptado de (Rosenbloom et al., 2017).

Os pontos amarelos mostram medições longitudinais de HIV-1 capaz de se replicar nos linfócitos T-CD4+ em repouso de um paciente. A frequência da infeção está descrita como unidades infecciosas por cada milhão de células (IUPM). A verde está representada a formação de um reservatório latente antes do tratamento, que persiste apesar da TARV (proporção demonstrada aos 3 e 6 meses), decaindo a uma taxa bastante lenta. A vermelho está um rápido declínio da carga viral. Uma menor quantidade de células infetadas, representadas a azul, tem um declínio a uma taxa moderada. Consequentemente, no início da terapêutica, apenas menos de 0,01% dos linfócitos T-CD4+ em repouso com vírus capaz de se replicar correspondem ao reservatório estável. Pelo contrário, 98% correspondem à carga viral em rápido declínio. Apenas após 1 ano de terapêutica se verificou uma estabilidade em mais de 95% dos reservatórios virais (Rosenbloom et al., 2017). Podemos então deduzir que diferentes velocidades de eliminação correspondem a diferentes tipos de reservatório.

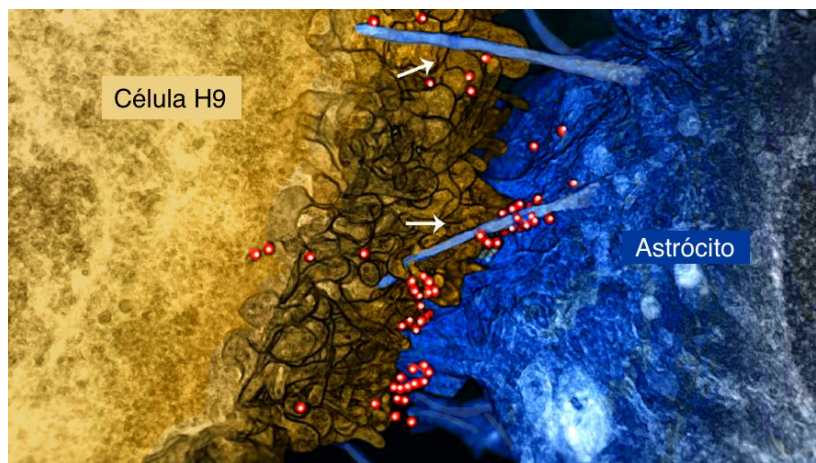
### **Tipos de reservatórios de HIV:**

- **Macrófagos**
- **Linfócitos T-CD4+ de memória**
- **Linfócitos T-CD4+ em repouso**
- **Células “natural killer”**
- **Células Tfh**

Estudos recentes demonstraram que os linfócitos T “follicular helper” (Tfh), que se encontram no interior dos folículos dos linfócitos B, podem, também, servir de reservatórios para os vírus, devendo-se ao facto de este tipo de folículos ser um local desprovido de células antivirais (linfócitos T citotóxicos e macrófagos), permitindo assim que o vírus persista nestes locais (Bunders & Altfeld, 2017).

- **Astrócitos**

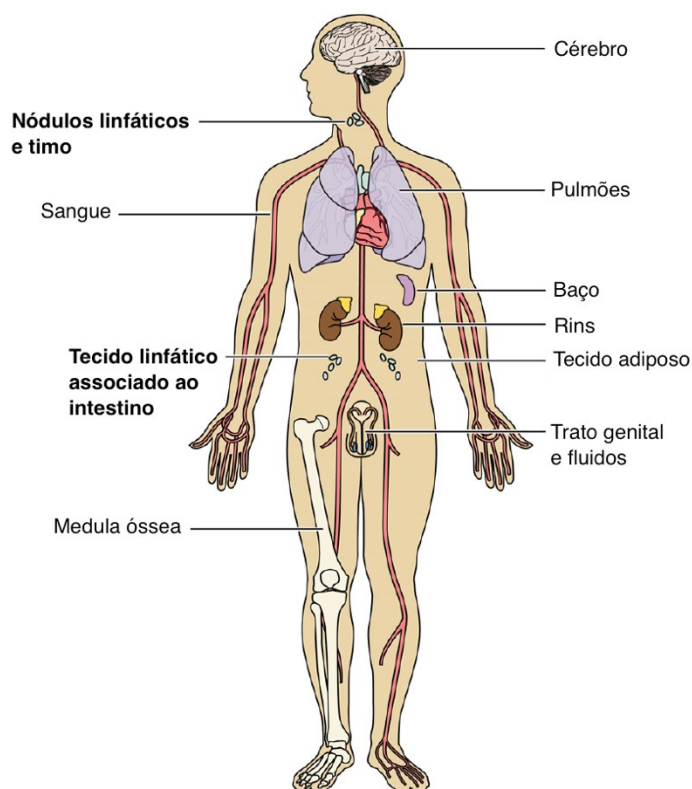
Os astrócitos são um dos tipos de reservatório do HIV-1, cujo processo de infeção ocorre através de sinapses virais. Os astrócitos, ao entrarem em contacto com os linfócitos T-CD4+ infetados, criam longos prolongamentos em direção aos mesmos, pelos quais as partículas virais atravessam até entrarem no astrócito, integrando-se no seu genoma (Figura 13) (Do et al., 2014).



**Figura 13** - Sinapse virológica no cérebro, entre uma célula H9 e um astrócito. Adaptado de (Do et al., 2014).

O HIV tem a capacidade de penetrar na barreira hemato-encefálica para infetar células do sistema nervoso central, incluindo macrófagos, microglias e astrócitos (Do et al., 2014).

Os reservatórios virais são rapidamente formados após o estabelecimento da infecção por HIV, disseminando-se por diversas zonas anatómicas do indivíduo infectado, representadas na Figura 14.



**Figura 14** - Locais anatómicos para os quais os reservatórios virais se disseminam. Adaptado de (Avettand-Fènoë et al., 2016).

## 4. Terapêutica Antirretroviral

### 4.1. TARV

A TARV deve ser iniciada o mais cedo possível após o diagnóstico da infecção por HIV, tendo, ao nível do sistema imunitário, vantagens significativamente superiores às desvantagens advindas dos riscos de sofrer reações adversas associadas à medicação. Na tabela X estão algumas recomendações da *International AIDS Society* (IAS) de 2018 (Saag et al., 2018):

**Tabela 3** – Recomendações terapêuticas da IAS. Adaptado de (Saag et al., 2018).

|   |
|---|
| <b>Recomendações da IAS para quando iniciar a TARV</b>  |
| O mais cedo possível após diagnóstico   |
| NNRTIs e abacavir não devem ser utilizados para um início rápido da TARV  |
| Profilaxia primária para a <i>Pneumocystis pneumonia</i> deve ser iniciada em pacientes com contagem de linfócitos T-CD4+ inferior a 200/uL |
| <b>Recomendações da IAS para os regimes iniciais de TARV</b>  |
| Bictegravir/TAF/emtricitabina   |
| Dolutegravir/abacavir/lamivudina  |
| Dolutegravir + TAF/emtricitabina  |

Nos casos de infeções perinatais por HIV, a abordagem atualmente considerada é o início de uma combinação de TARV por volta dos 2 ou 3 meses de idade, independentemente dos níveis de linfócitos T-CD4+. Porém, o início da terapêutica imediatamente após o nascimento pode representar benesses significativas podendo atenuar, diminuir a dimensão ou até impedir a formação de reservatórios virais (Frange et al., 2016).

#### **4.2. Imunoterapêutica com anticorpos amplamente neutralizantes (bnAbs)**

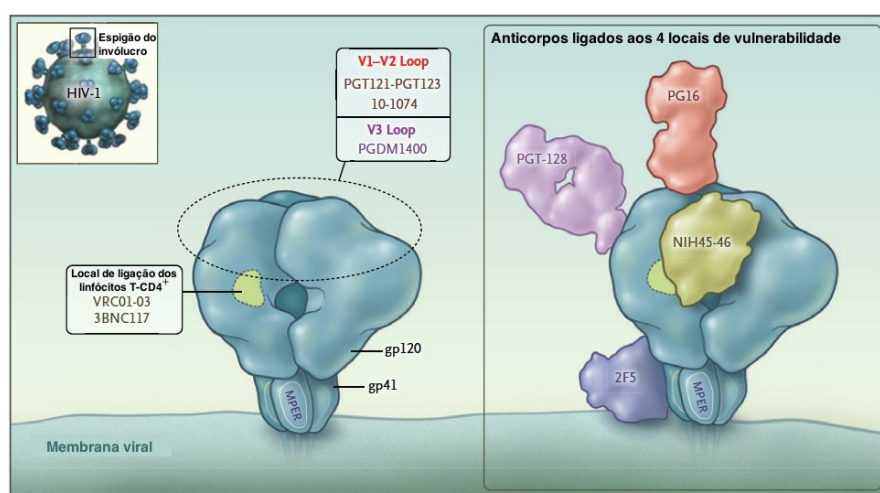
A imunoterapêutica é utilizada no controlo da patogenicidade, redução da inflamação e consequente prevenção da ativação do sistema imunitário por parte do HIV-1, de modo a normalizá-lo e, assim, possibilitar uma resposta imune específica e eficaz. Atualmente, a imunoterapêutica tem sido uma estratégia bastante estudada, tendo como intuito o desenvolvimento de uma cura funcional (Vieillard et al., 2016).

Esta estratégia consiste na manipulação de células dendríticas autólogas (extraídas do próprio indivíduo) de modo a expressarem o antígeno HIV e assim, ao serem injetadas, ativarem os reservatórios latentes de HIV e induzirem a ação antiviral dos linfócitos T-CD4+, que reduzem os reservatórios a menores quantidades. Apesar de ser uma técnica segura, a imunoterapêutica ainda não revelou resultados promissores, visto que a sua ação é transitória, pois, ao fim de algumas semanas após cessação da TARV, o vírus volta a desenvolver-se. (Ahmad & Rinaldo, 2017)

Os anticorpos amplamente neutralizantes (bNAbs) são uma nova geração de anticorpos de elevada potência capazes de neutralizar a maioria das estirpes de HIV (Caskey, Klein, & Nussenzweig, 2016).

Cada partícula viral de HIV é constituída por cerca de 8 a 14 espículas glicoproteicas à superfície do seu invólucro, aos quais os bNAbs se ligam para as neutralizarem, sendo cada espícula composta pela gp120 e pela gp41. Os bNAbs produzem-se apenas em cerca de 30% dos indivíduos infetados ao fim de um longo período de tempo (cerca de 3 anos) nos indivíduos infetados. Nos últimos anos têm vindo a ser isolados bNAbs capazes de neutralizar até cerca de 90% das estirpes existentes de HIV-1 em baixas concentrações, pelo que estes anticorpos poderão vir a ser importantes para tratar, prevenir e eventualmente ajudar a curar a infeção por HIV (Caskey et al., 2016).

Os bNAbs aderem ao local de ligação dos linfócitos T-CD4<sup>+</sup>, a zonas circunjacentes ao “V3 Loop” e ao ápice do espigão do HIV-1 (Figura 15) (Caskey et al., 2016).

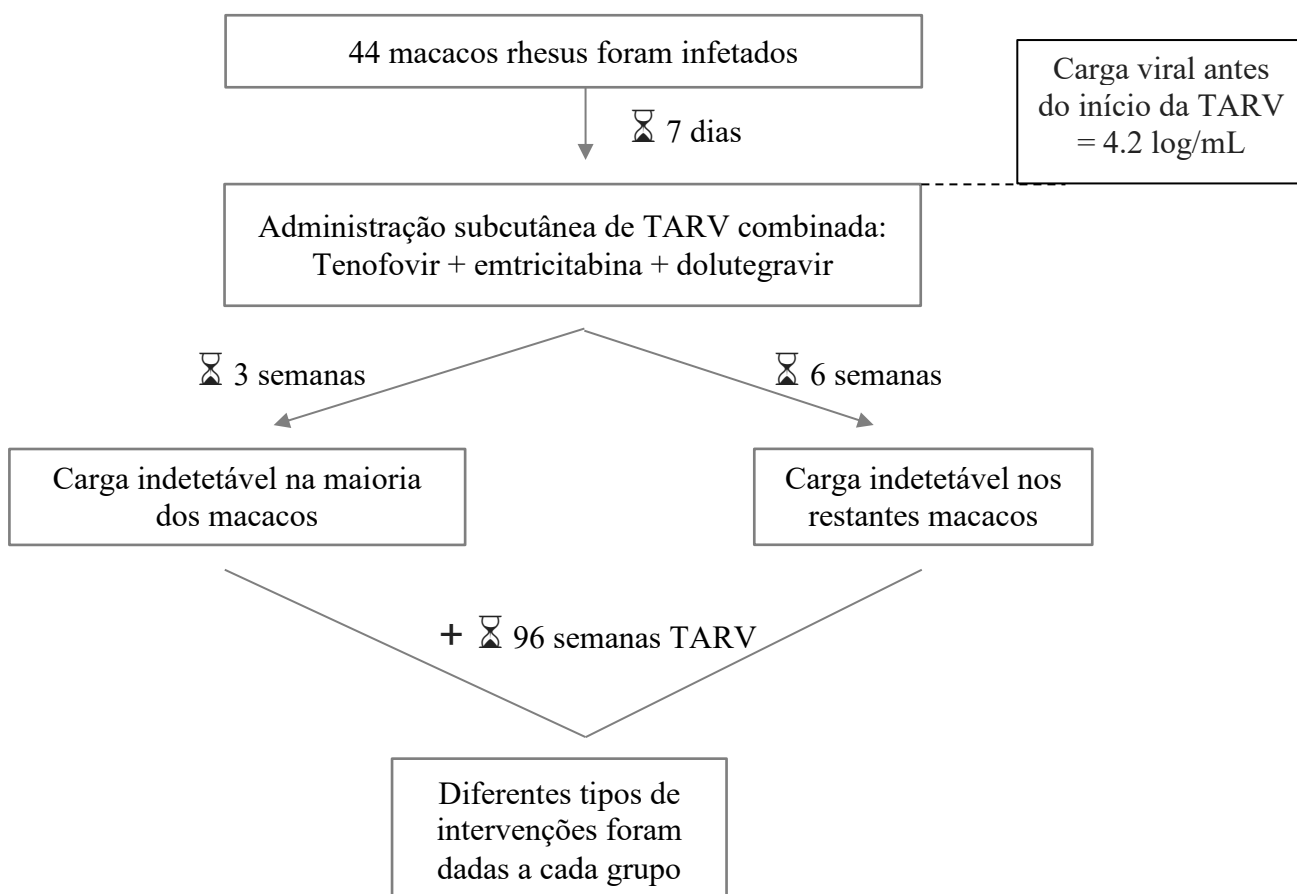


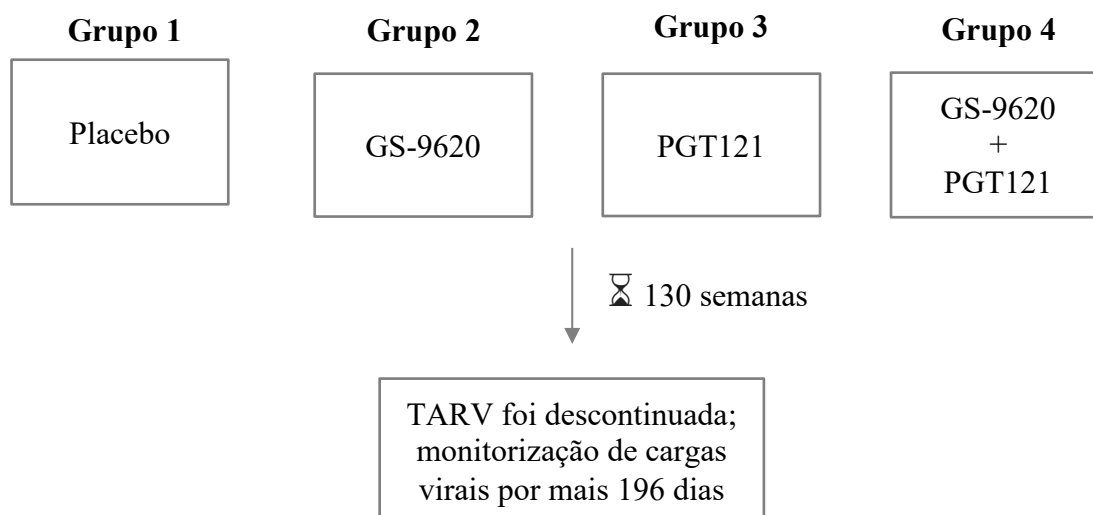
**Figura 15** - Espícula presente na superfície do HIV, mostrando locais onde os bNAbs se ligam. Adaptado de (Caskey et al., 2016).

O desenvolvimento do conhecimento acerca da farmacocinética dos bNAbs, bem como do perfil da sua ampla atividade, tem permitido identificar novas aplicações e oportunidades de terapêutica na prevenção e cura do HIV (Julg & Alter, 2016).

Foi recentemente demonstrado que uma única dose intravenosa dos bNAbs VRC01, 3BNC117 e 10-1074 protege macacos-rhesus (*Macaca Mulatta*) contra pequenas doses repetidas de SHIVAD8-EO. Nos animais previamente tratados com os bNAbs referidos apenas foi estabelecida infeção após 23 exposições virais, feitas semanalmente, contrariamente aos animais do grupo de controlo, que necessitaram apenas entre 2 a 6 exposições. (Gautam et al., 2016)

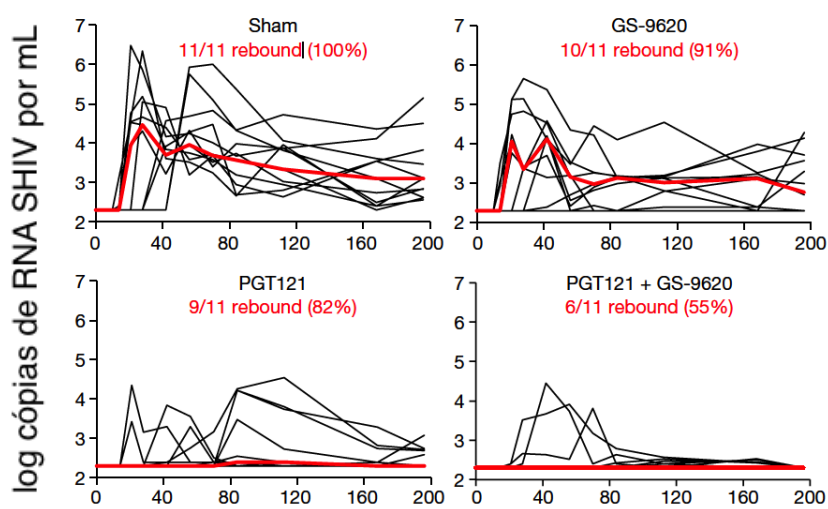
Tais estudos evidenciam a capacidade dos bNAbs de retardar a reativação viral. No entanto, é de extrema importância conhecer de que modo os bNAbs conseguem afetar os reservatórios virais durante a interrupção da TARV. Para tal, foi realizado um ensaio em que foi avaliada a capacidade do anticorpo neutralizante PGT121 e do vesatolimod (GS-9620) – agonista do TLR7 – de modificar os reservatórios virais em macacos rhesus infetados com SHIV.





**Figura 16** - Descrição esquemática do estudo anterior, que consiste na administração subcutânea de TARV combinada em macacos rhesus infectados.

## Resultados

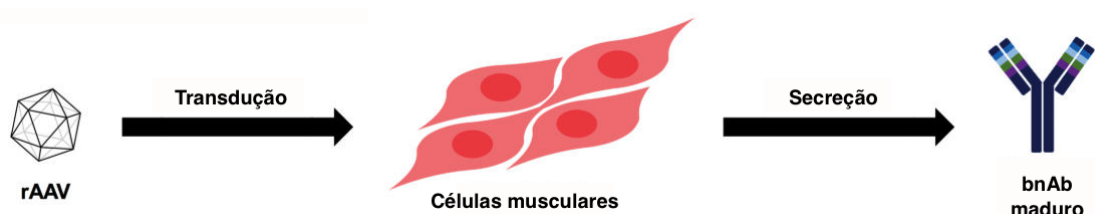


**Figura 17** - Cargas virais resultantes após descontinuação da TARV. Adaptado de (Antibody and TLR7).

O tempo médio para a reativação viral, ou “rebound”, no grupo 1 e no grupo 2 foi de 21 dias, enquanto que no grupo 4 foi de 112 dias. Para além disso, 45% dos macacos do grupo 4 mantiveram carga suprimida durante mais de 6 meses.

De um modo geral, estes resultados sugerem que a administração de bnAbs pode representar principalmente uma potencial estratégia na modificação dos reservatórios virais, para além da direta atividade antiviral (N. Borducchi et al., 2018).

Para além da técnica de injeção intravenosa dos bnAbs, a transferência genética podem também ser utilizada para os produzir “in vivo”. Neste caso, os transgenes codificadores de um determinado anticorpo são distribuídos pelos tecidos, resultando na sua secreção e expressão a nível sistémico, sendo os vírus associados ao adenovírus (AAV) os mais estudados na terapia genética (Brady, Baltimore, Balazs, & Engineering, 2018).



**Figura 18** - Terapia de transferência genética mediada por um vetor. Após uma única injeção intramuscular, o DNA recombinante encapsulado do vírus associado ao adenovírus (rAAV) é transduzido para as células musculares, formando um episoma no interior do núcleo do hospedeiro. Este episoma conduz à expressão dos genes codificadores dos bnAbs, que são secretados para a circulação sanguínea (Brady et al., 2018).

### 4.3. Imunoterapêutica com um inibidor de “check-point”

A interação entre o marcador de morte programada PD-1 e o ligando PD-L1 tem como função desativar a resposta dos linfócitos T contra antígenos, o que pode levar ao esgotamento dos linfócitos T-CD8+. As estratégias que contrariam o esgotamento dos linfócitos T-CD8+ específicos contra o HIV através dos inibidores de “check-point” imunológico são também um exemplo de imunoterapêutica (Vieillard et al., 2016).

Estudos revelaram que o anticorpo anti-PD-L1 (BMS-936559) pode ser um bom exemplo de inibidor de “check-point”, através de infusões únicas em doentes infetados sob terapêutica antirretroviral, tendo revertido a exaustão da resposta imunológica (Gay et al., 2017).

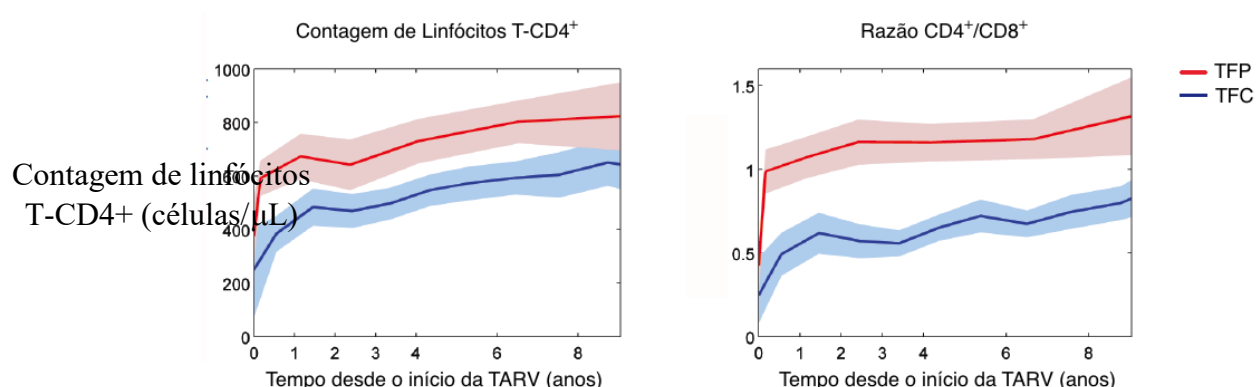


#### 4.4. Impacto da terapêutica (e da sua interrupção) nos reservatórios virais

A terapêutica antirretroviral permite a remissão viral, tendo a capacidade de manter o vírus controlado. Porém, não elimina a totalidade dos reservatórios virais, os quais permanecem em locais específicos do organismo, como referido anteriormente.

Durante o primeiro ano de tratamento, os reservatórios virais decaem dramaticamente, sendo que, posteriormente, o ritmo de decaimento abrandar, tornando-se mais estáveis (Strongin et al., 2018).

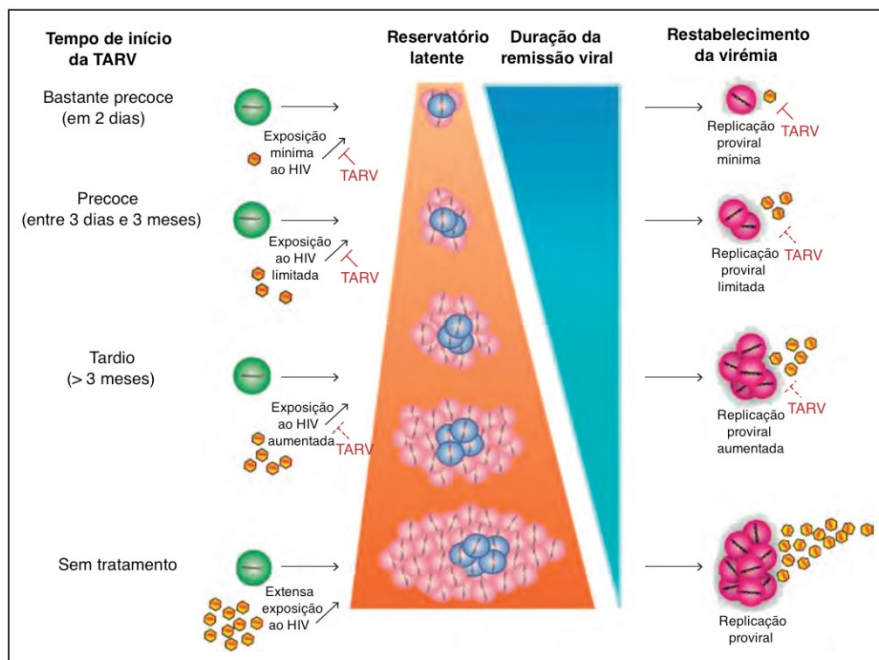
De modo a serem investigados os efeitos de TARV ininterrupta, a longo termo, nos reservatórios de HIV-1, foi realizado um estudo com 35 pacientes infetados, dos quais 9 iniciaram o tratamento durante a infeção primária por HIV-1 (TFP), e 26 iniciaram o tratamento na fase crónica (> 2 anos após a infeção) (TFC). Ambos os grupos permaneceram em supressão terapêutica durante, pelo menos, 10 anos. Após o início do tratamento, verificou-se um aumento dos níveis de linfócitos T-CD4<sup>+</sup> e da razão linfócitos T-CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> no grupo TFP (Buzon et al., 2014).



**Figura 19** - TARV prolongada iniciada na infeção primária do HIV-1. Trajetórias das contagens dos níveis de linfócitos T-CD4<sup>+</sup> (A), e razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (B), em pacientes com início de tratamento na fase primária (TFP) vs. Tratamento na fase crónica (TFC) da infeção. Adaptado de: (Buzon et al., 2014).

Estes dados indicam que um início de TARV durante a infeção primária está associado a um aumento dos níveis de linfócitos T-CD4<sup>+</sup> e da razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, em comparação com um início de TARV na fase crónica da infeção por HIV (Buzon et al., 2014)

Tal como indica a Figura 20, o início da terapêutica antirretroviral numa fase bastante inicial pode, também, evitar a formação de reservatórios virais, diminuir o seu tamanho e aumentar o tempo de remissão viral na interrupção da TARV (Rainwater-Lovett, Luzuriaga, & Persaud, 2015).



**Figura 20** - Efeito do tempo entre a infecção por HIV e o início da TARV sobre o tamanho dos reservatórios e a duração da remissão viral. Linfócitos T-CD4+ (verde); HIV (amarelo); linfócitos T-CD4+ produtivamente infectados (rosa); linfócitos T-CD4+ infectados em estado latente (azul); linfócitos T-CD4+ reativados (magenta). Adaptado de (Rainwater-Lovett et al., 2015).

Apesar da eficiência da TARV, baixos níveis de virémia plasmática permanecem detetáveis através de exames com alta sensibilidade ao RNA do HIV, os quais voltam a aumentar exponencialmente após interrupção da terapêutica (Hong & Mellors, 2015).

## **5. Cura da infecção por HIV**

Sabe-se que, atualmente, a infecção pelo HIV não é, ainda, curável. Porém, estudos estão a ser desenvolvidos para que a cura seja alcançada, sendo considerados dois tipos: a **cura funcional** e a **cura efetiva**.

### **5.1. Definição de cura efetiva e cura funcional**

É uma situação em que há uma viremia plasmática indetetável, na ausência de TARV (Chun, Moir, & Fauci, 2015; Wainberg, Han, & Mesplède, 2016).

#### **Cura efetiva**

Caracteriza-se pela ausência permanente de vírus no plasma (carga viral no plasma negativa) após descontinuação da TARV, ocorrendo eliminação total de todas as células infetadas e vestígios de HIV presentes no indivíduo. (Chun et al., 2015)

### **5.2. Justificação da necessidade de curar os doentes com HIV**

A grande evolução no desenvolvimento de medicação antirretroviral tem permitido uma maior adesão dos doentes infetados pelo HIV, devido às suas características menos tóxicas, e por serem de fácil administração. Porém, é necessária uma grande disciplina para o cumprimento eficaz desta terapêutica, que exige a toma diária de medicação, regra que nem sempre é cumprida pelos doentes (Tebas, 2018). Consequentemente, o vírus poderá criar resistências e tornar-se imune a certos tipos de terapêutica antirretroviral, sendo exigidas assim alterações nas combinações de fármacos, as quais não são inesgotáveis.

Atualmente, a esperança média de vida de um indivíduo com HIV sob terapêutica antirretroviral é de cerca de 50 anos. Tem sido reportado, ainda, que, com o avançar da idade, as taxas de doenças crónicas, como osteoporose, doenças renais e hepáticas, e, especialmente, doenças cardiovasculares aumentam nos indivíduos infetados com HIV (Tebas, 2018). Persiste, também, uma contínua ativação do sistema imunitário, mesmo tendo sido atingidos níveis mínimos de replicação viral, o que contribui para a progressão da doença (Dinh et al., 2015).

Em doentes infetados, tem-se verificado igualmente um aumento da prevalência de disfunções neurocognitivas associadas ao HIV (DNAH), fenómeno atualmente justificado pela incapacidade por parte de certos regimes de TARV de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), permitindo assim a permanência de reservatórios virais no cérebro (Mousseau, Mediouni, & Valente, 2015).

Foi também demonstrado que o tempo de semi-vida dos reservatórios virais no organismo é de cerca de 43.9 meses, sendo necessário um período de 73 anos para que os reservatórios virais sejam completamente erradicados, mesmo sob TARV, não sendo por isso possível curar um indivíduo infetado durante o seu tempo de vida só com TARV (Xu et al., 2017).

Todos estes factores, juntamente com os grandes custos da TARV, são preocupantes e justificativos de uma maior necessidade de desenvolvimento de estratégias de modo a alcançar, finalmente, uma cura funcional, ou, até mesmo, a cura efetiva do HIV (Didigu & Doms, 2014).

### **5.3. Caracterização da cura efectiva do “paciente de Berlim”**

O “paciente de Berlim”, Timothy Ray Brown, foi, até hoje, o único caso de cura efetiva de infeção por HIV-1. Para além de estar infetado pelo HIV-1, foi-lhe também diagnosticada leucemia mieloide aguda. Recebeu, então, transplante alogénico de células hematopoiéticas (TCH) de um dador com CCR5  $\Delta 32/\Delta 32$ , genótipo resultante de uma mutação no recetor CCR5 (Barton, Winckelmann, & Palmer, 2016; Hütter et al., 2009). Brown deixou nesse mesmo dia de tomar a medicação antirretroviral. Ao fim de 3 meses, deixaram de ser detetados quaisquer vestígios de HIV na sua corrente sanguínea (Brown, 2015).

Considera-se que a total erradicação do HIV se deveu, por um lado, às repetidas sessões de quimioterapia, seguidas de transplante de células estaminais, e ao desenvolvimento residual da doença da rejeição de transplante pelo hospedeiro. Por outro lado, devido à mutação CCR5- $\Delta 32$ , as células do dador de transplante não exprimiam o recetor CCR5, conferindo assim resistência aos novos linfócitos T-CD4<sup>+</sup> contra a infeção pelo HIV, prevenindo, deste modo, a formação de reservatórios (Chun et al., 2015; Hütter et al., 2009).

“I received the transplant on February 6, 2007, my new “birthdate.” With Dr. Huetter’s agreement, I stopped taking my HIV medication on the day of the transplant. (This is important because a continuation of antiretroviral therapy would have meant that no one would have known for a long time that I was cured of HIV.) After 3 months, **HIV was no longer found in my blood.**” (Brown, 2015).

Este conjunto de fenómenos representa fortes evidências de que uma cura para o HIV poderá ser possível, podendo ser alcançada através de terapia genética (Johnston, 2016).

#### 5.4. Caracterização de alguns casos de cura funcional

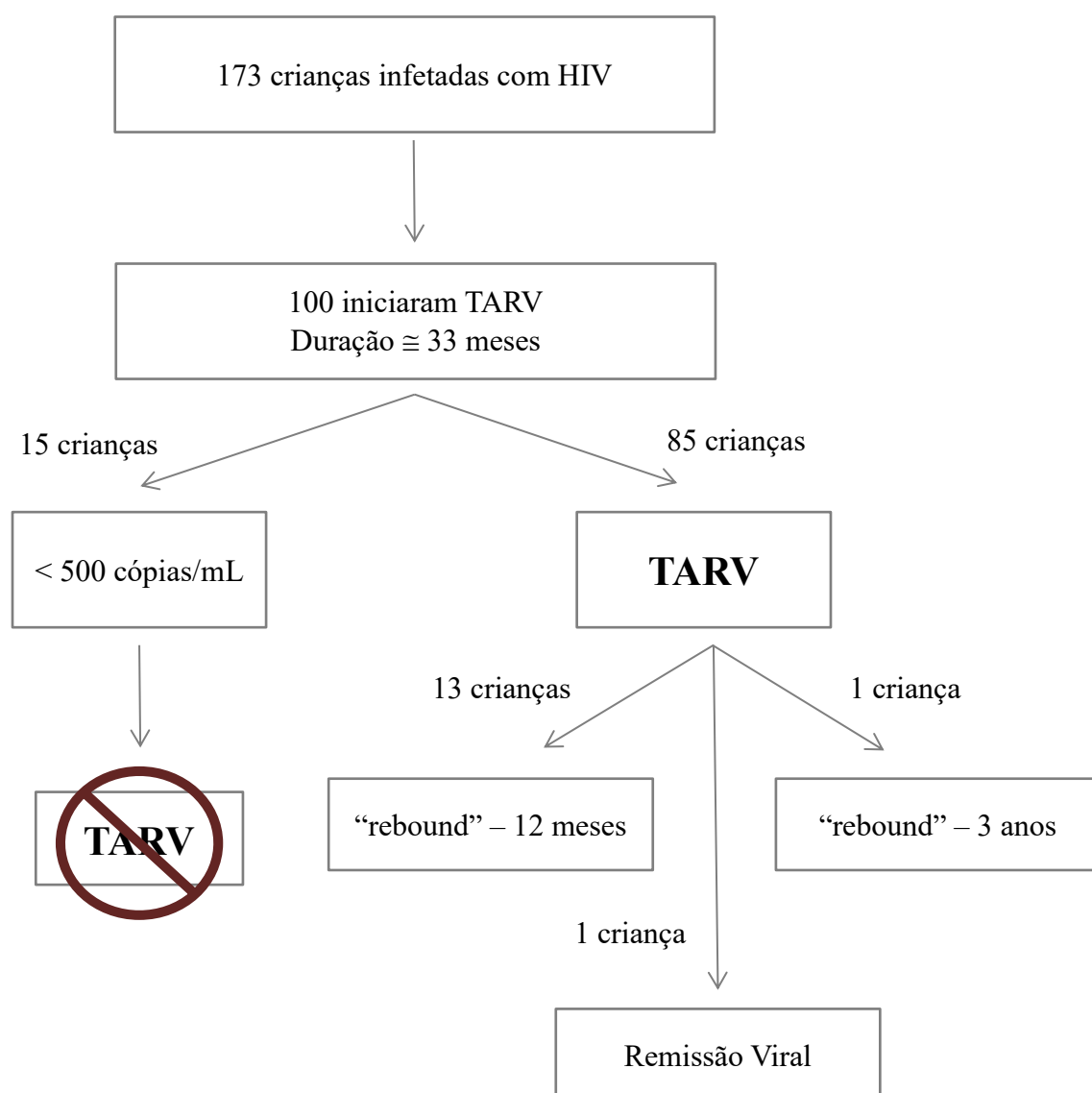
O HIV-2, conhecido por ser menos virulento do que o HIV-1, origina normalmente uma infecção assintomática. Apesar de terem quantidades semelhantes de DNA proviral integrado, na infecção por HIV-2 existe uma menor acumulação de mRNA viral no citoplasma, o que reduz a replicação viral (Saleh, Vranckx, Gijsbers, Christ, & Debyser, 2017).

Deste modo, muitos doentes infetados por HIV-2 podem ser exemplos de casos de cura funcional, por terem carga indetetável durante muitos anos na ausência de terapêutica.

Desde 1996, a agência de investigação francesa ANRS tem vindo a realizar um estudo-coorte com 173 crianças infetadas com HIV, desde a sua nascença. Dessas crianças, 100 iniciaram TARV combinada antes dos 6 meses de idade, a qual teve a duração média de 33 meses, sendo que 15 interromperam o tratamento enquanto a carga viral se manteve inferior a 500 cópias/mL.

Os resultados foram os seguintes:

- 13 crianças tiveram reaparição de carga viral ao fim de 12 meses
- 1 criança teve reaparição de carga viral ao fim de 3 anos
- 1 criança continuou até à data da publicação, em remissão viral, na altura com 18 anos (Frange et al., 2016).



**Figura 21** - Evolução do estudo-coorte realizado pela ANRS com 173 crianças infetadas por HIV.

### **5.4.1. Criança de Mississippi**

Um caso conhecido em que a TARV teve início precoce foi a criança de Mississippi, que recebeu tratamento apenas 30 horas após o seu nascimento, durante aproximadamente 18 meses. Verificou-se que, ao longo de 27 meses, a sua carga viral se manteve negativa na ausência de TARV (Goulder, Lewin, & Leitman, 2016; Rainwater-Lovett et al., 2015).

Num outro caso, uma criança recém-nascida, da Califórnia, iniciou a TARV 4 horas após o seu nascimento, tendo atingido carga negativa apenas 6 dias depois, e, simultaneamente, não foram identificados quaisquer reservatórios virais durante 9 meses.

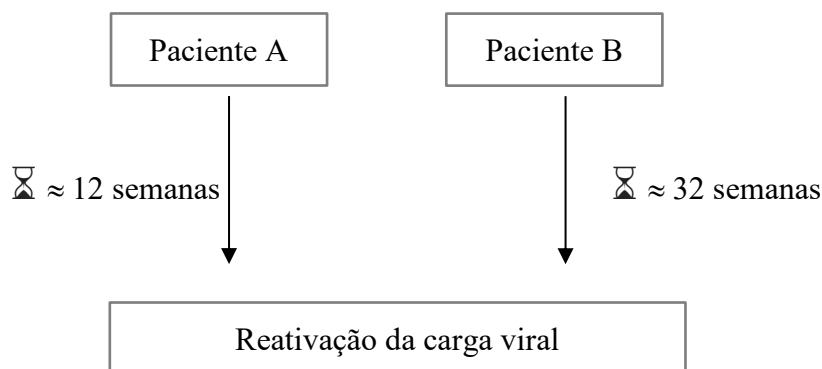
Quatro crianças Canadianas, também infetadas por HIV à nascença, iniciaram a TARV num prazo de 24 horas após o seu nascimento e mantiveram carga viral indetetável, não tendo sido também identificadas quaisquer células infetadas capazes de se replicar (Rainwater-Lovett et al., 2015).

### **5.4.2. Controladores Pós-tratamento (Estudo VISCONTI)**

Nos estudos virológicos e imunológicos em controladores após interrupção do tratamento (VISCONTI) verificou-se que 14 indivíduos infetados com HIV, que iniciaram a TARV na altura da infeção primária pelo HIV, conseguiram, após uma terapêutica de 36.5 meses, manter a remissão viral durante cerca de 7 anos e meio ao descontinuar a TARV, tendo a carga viral permanecido a  $< 400$  cópias/mL. Ficaram então identificados como os “controladores pós-tratamento” (Archin & Margolis, 2014; Goulder et al., 2016).

### **5.4.3. Pacientes de Boston**

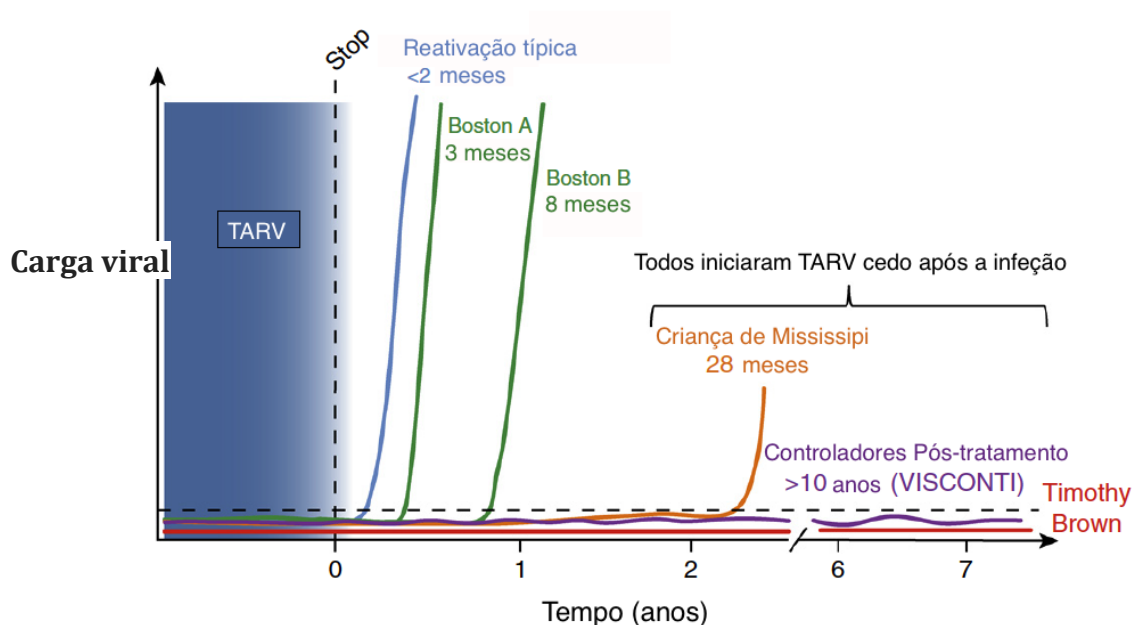
Dois indivíduos infetados pelo HIV, os pacientes de Boston, sofreram também um processo de transplante de células estaminais hematopoiéticas. Como resultado, apesar dos reservatórios terem diminuído significativamente de tamanho, houve reaparição da carga viral.



**Figura 22** - Tempo decorrido entre a interrupção da TARV e a reativação da carga viral, nos pacientes de Boston.

No paciente B, o “rebound” deveu-se a **um único vírus**, reforçando a ideia de que uma cura só será possível eliminando todos os vírus em estado latente capazes de se replicar, ou inibindo por completo a sua reativação (Douek, 2018).

A Figura 23 compara graficamente o tempo necessário para a reativação viral em cada um dos casos descritos anteriormente, após descontinuação da TARV. Está também incluído o caso de cura efetiva do “Paciente de Berlim” (Timothy Brown), já abordado anteriormente.



**Figura 23** – Tempo decorrente entre os diferentes casos de cura até uma reativação da carga viral, após interrupção da TARV. Adaptado de (Deeks et al., 2016).



## 5.5. Revisão das estratégias de cura efectiva e cura funcional em curso

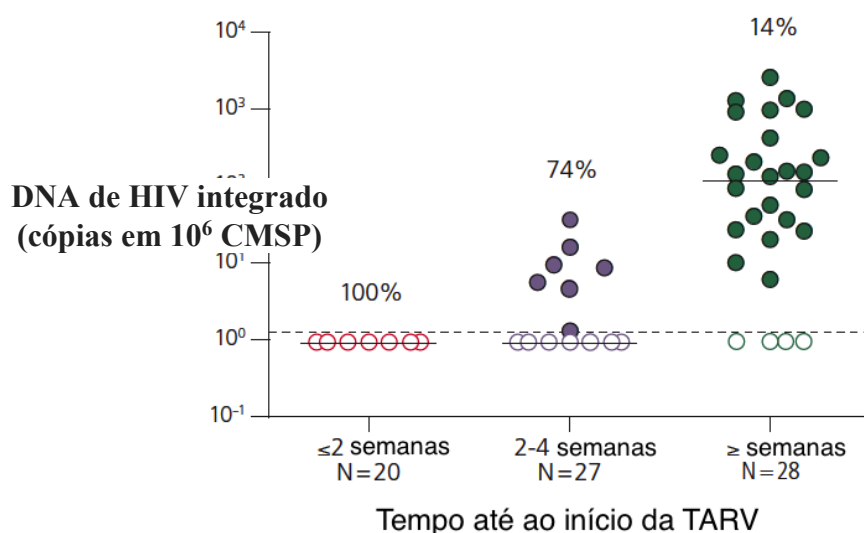
### 5.5.1. Estratégias de cura funcional

#### Tratamento precoce

Este foi o método utilizado em algumas crianças que obtiveram uma cura temporária, tal como referido anteriormente.

Assim que o RNA do HIV se torna detetável, a dimensão dos reservatórios aumenta rapidamente em apenas 2 semanas. Deste modo, ao dar início à TARV o mais cedo possível após a deteção, pode ser alcançada uma drástica diminuição do tamanho dos mesmos.

Na Figura 24 podemos observar que, de facto, um início de tratamento antes das 2 semanas após deteção está associado a reservatórios de tamanhos praticamente indetetáveis, contrariamente a um início de tratamento entre as 2 e as 4 semanas, ou, até, já na fase crónica da infeção (Douek, 2018).



**Figura 24** - Efeito da TARV precoce sobre a dimensão dos reservatórios virais. Adaptado de (Douek, 2018).

## Aumento da função imune específica contra o HIV – Vacinação terapêutica

A vacinação terapêutica é uma das estratégias de cura da infeção por HIV atualmente a serem consideradas e estudadas.

Num estudo, após terem sido infetados pelo SIV, 16 macacos foram vacinados com uma vacina constituída por um vetor de citomegalovírus (CMV). Houve controlo da virémia em 9 macacos, e, em 8 macacos, chegou-se até a erradicar o vírus, não tendo sido encontradas quaisquer evidências do mesmo nos seus órgãos ou sangue.

Acredita-se que, possivelmente, estes resultados se deveram à capacidade por parte do vetor do CMV de gerar respostas imunológicas contínuas e rápidas ao nível da mucosa, controlando o vírus e impedindo-o assim de se alastrar (Ananworanich, 2015).

Porém, o CMV pode passar a barreira hematoencefálica e causar meningites fatais, pelo que esta intervenção está fora de questão nos homens enquanto não se conseguir atenuar ou eliminar esta característica do CMV.

### 5.5.2. Estratégias de cura efetiva

#### “Shock-and-kill”

Um dos maiores obstáculos na obtenção de uma cura para a infeção pelo HIV são os reservatórios virais, pois não só permanecem latentes nos linfócitos T-CD4+ sendo indetetáveis pelo sistema imunitário, como também são os responsáveis pela reaparição da carga viral quando a TARV é descontinuada (Didigu & Doms, 2014).

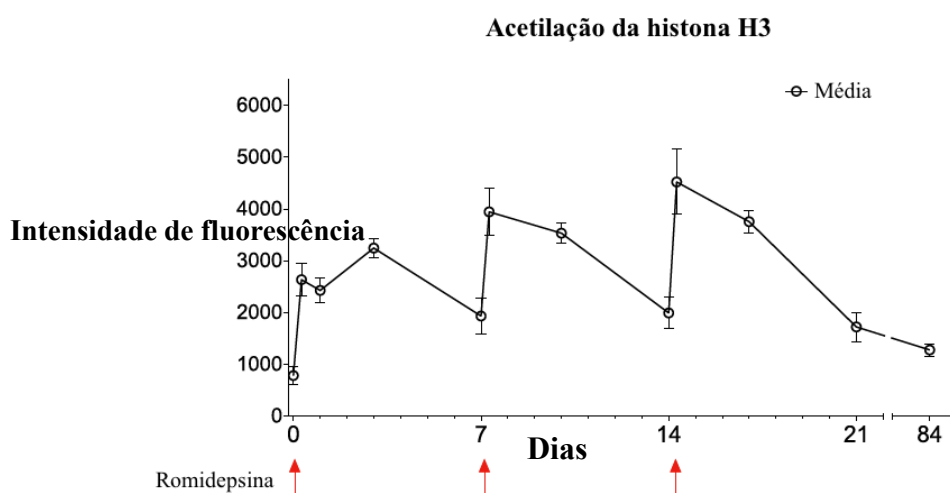
Assim, é necessária a eliminação integral dos reservatórios virais. O método mais estudado atualmente é o *shock and kill*, que consiste na ativação dos reservatórios latentes, que irão produzir vírus (*shock*), para serem, seguidamente, eliminados (*kill*) (Didigu & Doms, 2014).

### Os agentes “shock” englobam:

- Inibidores das histonas deacetilases (HDAC);
- Inibidores brodomínios e extraterminais (BET);
- Inibidores da DNA metiltransferase (DNMT);
- Ativadores da proteína cinase C (PKC);
- Citocinas e quimiocinas (Xu et al., 2017).

Um mecanismo importante para a manutenção da latência dos reservatórios virais é a ação das histonas deacetilases (HDAC), que, ao promoverem a deacetilação das histonas, provocam a condensação da cromatina, formando heterocromatina. Assim, a acessibilidade do DNA aos fatores de transcrição diminui, tornando-se inviável a transcrição proviral (Darcis, Van Driessche, & Van Lint, 2016; Søgaaard et al., 2015). Deste modo, as HDAC representam um alvo relevante na ativação dos reservatórios virais.

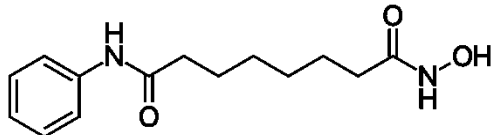
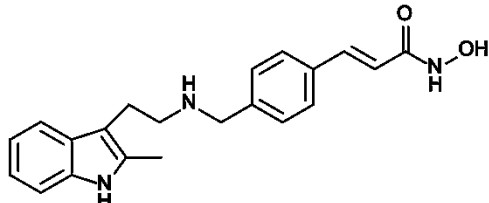
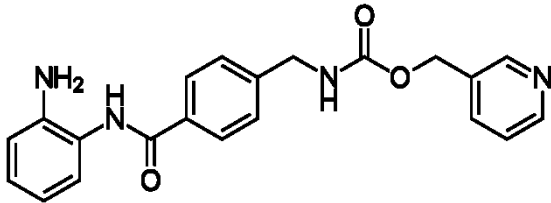
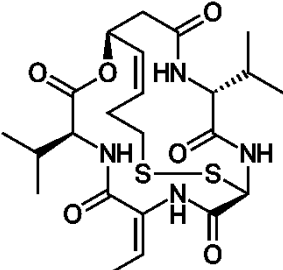
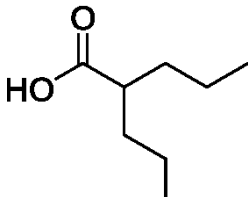
Através da técnica de citometria de fluxo, observou-se, num estudo com pessoas caucasianas infectadas por HIV, um aumento progressivo da acetilação da histona H3 ao longo de infusões de romidepsina, o que corrobora a eficácia deste fármaco (Figura 25) (Søgaaard et al., 2015).



**Figura 25** - Média dos níveis de acetilação da histona H3, medidos através da citometria de fluxo em linfócitos. Adaptado de (Søgaaard et al., 2015).

Para além da romidepsina, existem outros fármacos inibidores da histona deacetilase (iHDAC) que têm vindo a demonstrar resultados satisfatórios na ativação de reservatórios virais (Darcis et al., 2016). Na tabela 4 estão representados alguns dos mais estudados:

**Tabela 4** - Fármacos iHDAC. Adaptado de (Darcis et al., 2016).

|                        |  |
|------------------------|--|
| <b>Vorinostat</b>      |    |
| <b>Panobinostat</b>    |    |
| <b>Entinostat</b>      |   |
| <b>Romidepsina</b>     |  |
| <b>Ácido valpróico</b> |  |

Apesar de bastante promissora, esta estratégia também constitui algumas barreiras que impedem a sua eficácia na erradicação total do vírus, tais como:

- Durante a TARV, o HIV pode ser detetado não só na circulação sanguínea, mas também em diferentes locais extravasculares, podendo ser tecidos linfáticos ou não linfáticos, ou até, por vezes, células parenquimatosas ou mieloides. (Wong & Yukl, 2016)
- Apesar da especificidade para os linfócitos T-CD4+, o facto de existir uma grande variedade e ampla distribuição destas células torna complicado perceber onde, e em que medida, o HIV persiste. (Boritz & Douek, 2017)

Recentemente, em Agosto de 2018, foi descoberto que **o recetor de estrogénio (RE)** tem uma influência preponderante na manutenção do estado de latência do HIV-1 em humanos (Bick & Hapgood, 2018). A primeira evidência de que o ER pode ser controlado farmacologicamente foi descrita por Das, B. et al, sendo considerada uma terapia promissora na reativação das células latentes.

### **Agentes “Kill”**

O uso de anticorpos direcionados às proteínas do invólucro do HIV é um método também abordado e estudado na erradicação do HIV no organismo. Aquando da reversão do estado de latência dos reservatórios virais, tais proteínas são expressas à superfície dos mesmos, permitindo assim certos tipos de anticorpos reconhecê-los, tal como os anticorpos amplamente neutralizantes (Julg & Alter, 2016; Siliciano & Siliciano, 2016).

Outros métodos usados na eliminação dos vírus após ativação dos reservatórios latentes são: vacinas terapêuticas, bnAbs e anticorpos não neutralizantes (nnAbs) (Horwitz et al., 2017).

### **Transplante de células estaminais hematopoiéticas**

Após o sucesso na cura do “paciente de Berlim”, surgiu um grande interesse em estudar mais aprofundadamente o transplante de células estaminais hematopoiética como estratégia de cura do HIV.

Nos primeiros estudos em que foi utilizado transplante de células como estratégia de cura da infecção por HIV foi realizado um transplante autólogo de linfócitos T-CD4+ manipulados ex vivo com um gene promotor da produção de proteínas ou RNA antivirais. Têm sido, desde então, estudados diversos genes expressores de proteínas ou RNA, isolados ou combinados, de modo a avaliar a sua eficácia e segurança (Scarborough & Gagnon, 2018).

Proteínas que estão a ser testadas em ensaios clínicos de cura funcional ou efetiva:

- Proteínas HIV-1 Rev trans-dominantes que inibem a migração do RNA de HIV-1 de cadeia simples para o citoplasma;
- Péptido gp41 C (C46) que inibe a entrada do vírus;
- Proteína quimérica “human-rhesus tripartite motif 5  $\alpha$  (TRIM5 $\alpha$ -HRH) que têm como alvo a cápside do HIV-1.

A preocupação principal na utilização destes genes é a eventualidade de produzirem péptidos que sejam reconhecidos pelo sistema imunitário como corpos estranhos, resultando numa ativação imunológica crónica ou na eliminação de células resistentes ao HIV-1.

Outra abordagem para uma cura funcional utilizando o método de transplante celular com base em genes codificadores de proteínas seria a inserção de enzimas capazes de modificar o gene CCR5, mimetizando o genótipo CCR5 $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32 (Scarborough & Gagnon, 2018).

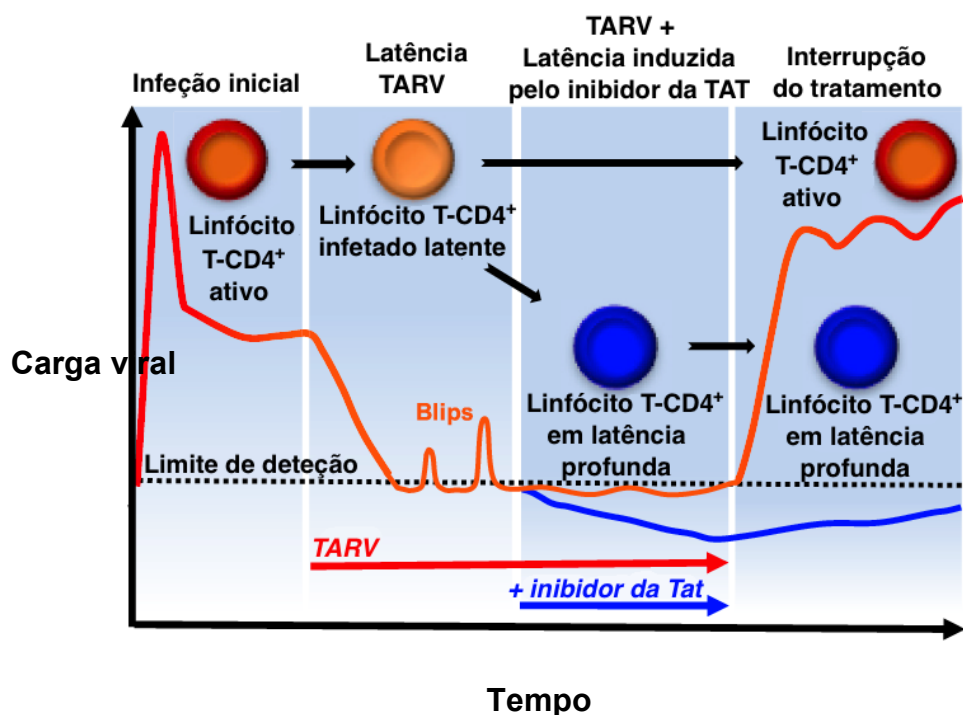
### **Agentes terapêuticos tendo por alvo a transcrição do HIV**

O uso de agentes terapêuticos que atuam na transcrição do HIV é uma estratégia também a ser investigada. O objetivo seria alcançar a supressão viral dos resíduos resultantes da transcrição viral presentes nas células latentes, tornando impossível a sua reativação. Um inibidor da transcrição viral combinado com TARV poderia impedir a replicação do vírus ou a sua reativação (“blips”), reduzindo assim a dimensão dos reservatórios virais (Mousseau et al., 2015).

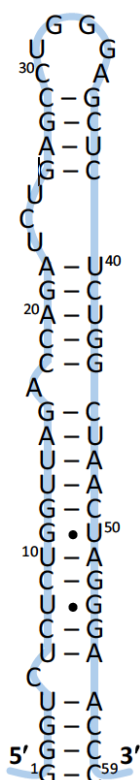
A inibição da transcrição viral, para além de ser uma estratégia promissora na cura funcional do HIV, poderia também ter um impacto benéfico na redução de comorbilidades nos indivíduos em supressão viral que fazem TARV, visto que iria reprimir a contínua ativação imunológica causada pelos baixos níveis de replicação viral. Consequentemente, atingindo a “deep-latency”, a TARV poderia ser interrompida sem posterior reativação viral, sendo possível alcançar assim a cura funcional.

Na transcrição do HIV, a proteína HIV Tat tem uma função fundamental, por recrutar a atividade da proteína quinase do complexo do fator de alongação transcricional (P-TEFb) para o elemento de resposta de transativação (RTA) da estrutura de RNAm viral, acionando assim a alongação transcricional. Sendo expressa numa fase inicial do ciclo de vida do HIV e não tendo células homólogas, a proteína Tat é considerada um alvo importante no desenvolvimento de uma terapêutica que alcance a cura funcional (Mousseau et al., 2015). Prevê-se que, inibindo a interação Tat/RTA, irá ocorrer uma redução drástica da produção viral, estando sob foco no desenvolvimento de compostos antivirais (Mousseau et al., 2015).

Em estudos bastante recentes, foi identificada a didehidro-cortistatina A (dCA), potente inibidora da Tat. A dCA tem a capacidade de conduzir a expressão génica a um estado de latência persistente, impedindo assim a reativação viral por parte dos agentes de reversão de latência (LRA). Esta abordagem pode ser caracterizada como uma cura funcional do tipo “block-and-lock”: através de uma crescente repressão epigenética do promotor do HIV, os inibidores da Tat poderiam bloquear a contínua transcrição viral durante a TARV, bem como a reativação das células latentes, originando um estado de latência persistente (Kessing et al., 2017).



**Figura 26** - Estratégia "Block-and-Lock" para a cura funcional do HIV-1. Adaptado de (Kessing et al., 2017).



# TAR

O elemento de resposta de transativação (TAR) do RNA tem a forma de um gancho de cabelo e é constituído por uma sequência de 59 nucleótidos na repetição terminal longa (RTL) do genoma de HIV-1, formando 24 pares de bases (Figura 27), cuja estrutura é fundamental para a transcrição viral mediada pela proteína transativadora Tat (McCauley et al., 2015).

**Figura 27** - Elemento de resposta de transativação (TAR) (McCauley et al., 2015).

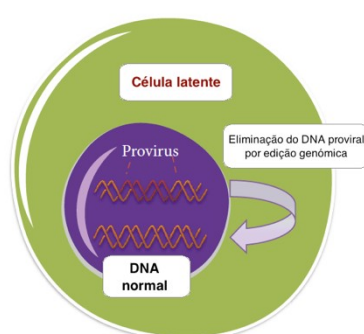


## Terapia genética

### Terapia genética para erradicação dos reservatórios de HIV

A terapia genética tem por base estratégias que envolvem edição genómica, que possibilita aos investigadores manipular qualquer gene de vastos tipos de células e organismos (Liu, Gaj, Wallen, & Barbas, 2015a).

A técnica de edição genómica ideal seria capaz de editar qualquer locus genómico com alta eficiência e especificidade na sequência de DNA.



**Figura 28** – Estratégia de terapia genética para erradicação dos provírus de HIV de células latentes através de ZFN, TALENs ou CRISPR. Adaptado de (Xu et al., 2017).

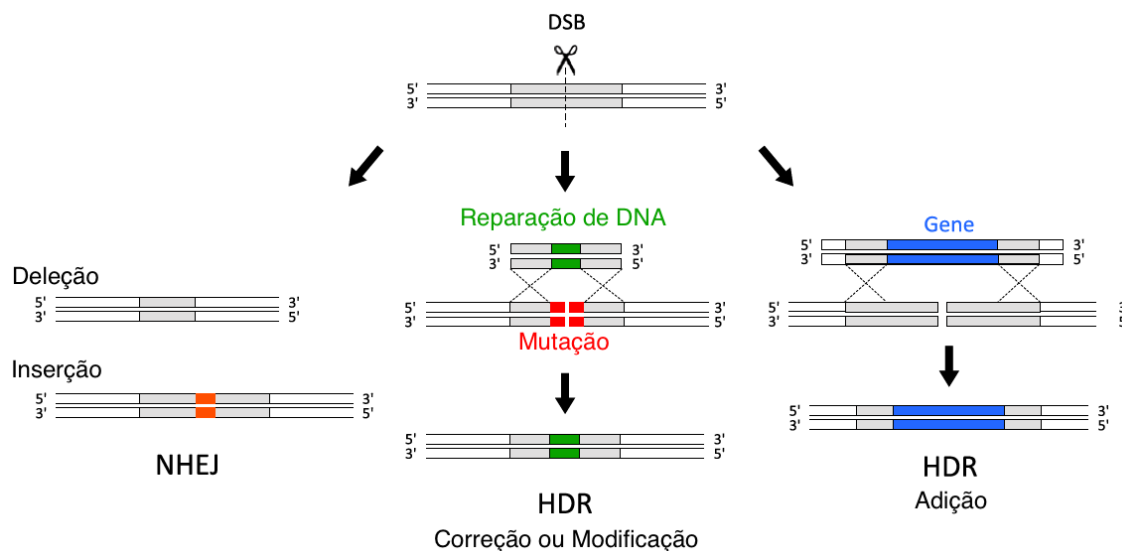
As tecnologias mais utilizadas são:

- Nucleases de dedo de zinco (ZFN)
- Nucleases efetoras semelhantes a ativadores de transcrição (TALENs)
- Nuclease Cas 9 associada a repetições palindrómicas curtas agrupadas e regularmente interespçadas (CRISPR-Cas9) (Benjamin et al., 2016; Geng et al., 2016; Limsirichai, Gaj, & Schaffer, 2016).

Estes sistemas estão geralmente configurados para induzirem quebras de dupla cadeia (DSBs) numa determinada sequência-alvo, o que despoleta os mecanismos de reparação de DNA, que consequentemente poderão resultar em:

- Inserção ou deleção de pequenas sequências de DNA na zona das DSB, através da junção de duas extremidades não homólogas (NHEJ) (Araki & Ishii, 2014; Liu, Gaj, Wallen, & Barbas, 2015);

- Reparação causada por homologia (HDR) (Araki & Ishii, 2014), baseando-se num modelo dador, no qual pode ocorrer adição, modificação ou correção de genes (Araki & Ishii, 2014).



**Figura 29** - Mecanismos de reparação de DNA induzidos por nucleases. Adaptado de (Araki & Ishii, 2014).

### Nucleases de Dedo de Zinco (ZFN)

São proteínas sintetizadas, anexadas a uma endonuclease (FokI), que reconhecem sequências específicas de DNA, através da ligação de cada ZFN a 3 pares de bases em cadeias opostas de DNA, permitindo assim a clivagem do DNA-alvo pelas FokI.

Uma abordagem promissora consiste na remoção de linfócitos T-CD4<sup>+</sup> ou de células estaminais hemotopoiéticas de CD34<sup>+</sup> de um indivíduo infetado com HIV e consequente tratamento com ZFNs. Estas reconhecem e clivam o gene CCR5 que, deste modo, não poderá ser expressar o coreceptor CCR5. Após a sua multiplicação, estas células são inseridas novamente no indivíduo (Douek, 2018).

### Nucleases efetoras semelhantes a ativadores de transcrição (TALENs)

As proteínas efetoras semelhantes a ativadores de transcrição (TALE) são compostas por uma região N-terminal (NTR), região de repetição, e região C-terminal (CTR). A NTR é uma parte essencial do domínio de ligação ao DNA do TALE (TBD), constituindo, no mínimo, cerca de quatro repetições, zona onde ocorre a interação TALE/DNA. Cada repetição medeia a ligação a um par de bases da sequência alvo, sendo que a cada uma delas estão associados 34 aminoácidos; os aminoácidos 12 e 13 designam-se diresíduos de repetição variável (RVDs) e conferem a especificidade de cada repetição (Benjamin et al., 2016; Schreiber & Tissier, 2016).

Cada RVD é específico para um nucleótido, sendo os seguintes os mais comuns:

**Tabela 5** - RVDs específicos para os diferentes nucleótidos (Schreiber & Tissier, 2016).

| <b>RVD</b> | <b>Nucleótido</b> |
|------------|-------------------|
| HD         | Citosina          |
| NI         | Adenina           |
| NG         | Timina            |
| NK         | Guanina           |
| NN         | Guanina/Adenina   |

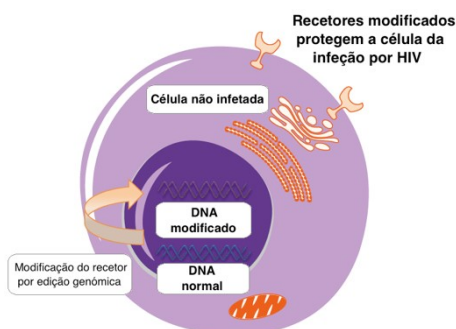
Posteriormente à descoberta das TALEs, investigadores procederam à junção da endonuclease FokI com dedos de zinco, criando assim as TALE/FokI, designadas nucleases efetoras semelhantes a ativadores de transcrição (TALENs). Estas nucleases têm a função específica de se ligarem e quebrarem às suas cadeias alvo de DNA, criando assim uma interrupção na dupla cadeia de DNA, estimulando os sistemas de reparação de DNA (Benjamin et al., 2016).

## CRISPR/Cas9

O sistema CRISPR constitui um complexo formado por uma sequência-guia de RNA com 20 nucleótidos (gRNA), que reconhece um local específico do DNA pelo emparelhamento básico de pares de bases, e pela nuclease Cas9, responsável pela sua clivagem, gerando assim interrupções na dupla cadeia de DNA (Komor, Badran, & Liu, 2017; Zhu et al., 2015). A sequência de DNA alvo (“protospacer”) contém um “protospacer-adjacent motif” (PAM) que consiste numa sequência curta de DNA essencial para a compatibilização com a nuclease Cas9 (Komor et al., 2017).

### **Terapia Genética na Prevenção de Células Suscetíveis da Infecção por HIV**

Uso de ZFNs para gerar uma mutação nos recetores CCR5 dos linfócitos T-CD4+, promovendo assim a proteção das células contra a infecção por HIV (Xu et al., 2017).



**Figura 30** – Estratégia de terapia genética para prevenir a infecção por HIV em células suscetíveis. Adaptado de (Xu et al., 2017).

Estratégia tendo por alvo a região do polimorfismo da deleção  $\Delta 32$  no gene CCR5 (CCR5 $\Delta 32$ ), mimetizando o polimorfismo natural encontrado no Paciente de Berlim. Porém, a principal barreira desta estratégia é a limitação do potencial replicativo dos linfócitos T-CD4+. Daí veio a necessidade de estudar formas de manter os indivíduos infectados a produzir esses linfócitos T-CD4+ modificados.

Apesar das células estaminais hematopoiéticas modificadas terem a capacidade de produzir continuamente células que impossibilitam a replicação do HIV, estas podem perder a sua habilidade de diferenciação na cultura “in vitro”. Outro dos principais desafios da terapia genética é como conseguir de uma forma eficiente, precisa e segura inserir as células estaminais na medula óssea (Xu et al., 2017).

## 5.6. Ensaios clínicos em curso na investigação de uma cura

**Tabela 6** – Ensaios clínicos em curso. Retirado de [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov).

| Título do estudo  | Intervenções   | Identificador do estudo | Fase            |
|---|--|-------------------------|-----------------|
| <i>Analytic Treatment Interruption (ATI) to Assess HIV Cure</i>   | Outra: Interrupção do tratamento analítico   | NCT02437526             | <b>Em curso</b> |
| <i>IMPAACT P1107: Effects of Cord Blood Transplantation With CCR5Δ32 Donor Cells on HIV Persistence</i>                         |  | NCT02140944             | <b>Em curso</b> |
| <i>Reducing Proviral HIVDNA With Interferon-α</i>   | Farmacológica: Peg-IFN-α2b   | NCT02227277             | <b>Em curso</b> |
| <i>LRAs United as a Novel Anti-HIV Strategy.</i>  | Farmacológica: Ácido valpróico<br>Farmacológica: Pirimetamina  | NCT03525730             | <b>Em curso</b> |
| <i>Peg-Interferon Alpha 2b Combined With Two Intravenous Broadly HIV-1 Neutralizing Antibodies 3BNC117 and 10-1074 (BEAT-2)</i> | Farmacológica: Interferon alfa 2b peguilado (peg-IFN-α2b)<br>Farmacológica: 3BNC117 + 10-1074                      | NCT03588715             | <b>Em curso</b> |
| <i>Developing a Functional Cure for HIV Disease: Clinical Specimen Collection From HIV Positive Individuals</i>                 |  | NCT03215004             | <b>Em curso</b> |
| <i>Multi Interventional Study Exploring HIV-1 Residual Replication: a Step Towards HIV-1 Eradication and Sterilizing Cure</i>   | Farmacológica: Maraviroc<br>Farmacológica: Dolutegravir<br>Biológica: Vacina de células dendríticas (entre outros) | NCT02961829             | <b>Em curso</b> |

|   |   |             |                 |
|---|---|-------------|-----------------|
| <i>Towards HIV Functional Cure</i>  | Outra: Interrupção da TARV  | NCT01876862 | <b>Completo</b> |
| <i>Exploratory Study of Cellular Reservoirs in Blood From HIVInfected Patients</i>  | Outra: amostra sanguínea adicional                                    | NCT02858414 | <b>Em curso</b> |
| <i>HIV Eradication Through Cord-blood Transplantation</i>   | Outra: Transplante do sangue do cordão umbilical CCR5 delta32/delta32 | NCT02923076 | <b>Em curso</b> |
| <i>Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation inHIV-1 Infected Patients</i>   |   | NCT02732457 | <b>Em curso</b> |
| <i>Reconstitution of HIV-specific Immunity Against HIV</i>  | Biológico: linfócitos T-CD8+ específicos para HIV                     | NCT02563509 | <b>Completo</b> |
| <i>Functional Cure Study of HIV-infected Patients</i>   | Procedimento: curso da TARV   | NCT02794545 | <b>Completo</b> |
| <i>Impact of Extremely Early Antiretroviral Therapy to Reduce Viral REservoir and Induce Functional CURE of HIV-1 Infection</i> | Farmacológica: Terapêutica antirretroviral (Experimental)             | NCT02588820 | <b>Em curso</b> |
| <i>Analytical Treatment Interruption in HIV Positive Patients</i>   | Outra: interrupção da TARV  | NCT02590354 | <b>Completo</b> |

## 6. Considerações éticas e sociais

Pelo facto de atualmente um indivíduo infetado pelo HIV poder ter carga viral indetetável, permitindo-lhe ter uma vida normal, o que anteriormente era impensável, a investigação para a cura do HIV é agora um enorme interesse público e científico, tornando-se uma prioridade da “International AIDS Society and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases”. Contudo, a investigação de uma cura, seja qual for a doença, não é linear, isto é, todos os esforços podem permitir o alcance de uma cura, mas, por outro lado, podem também falhar, eventualmente causando uma certa desconfiança e suspeição por parte dos doentes e do público em geral. A procura de uma cura pode, também, levantar certos prolemas éticos relacionados com a avaliação e comunicação dos riscos e benefícios dos estudos. Eis alguns exemplos de circunstâncias que possam criar inquietações de um ponto de vista ético:

- Ensaios precoces podem estar associados a graves riscos, produzindo, numa fase inicial, apenas pequenos avanços.
- A seleção dos participantes na investigação de uma cura precoce, normalmente com características específicas, pode despoletar a sensação de injustiça, podendo estes eventualmente beneficiar de intervenções bem-sucedidas que outros indivíduos infetados não beneficiariam.
- Perceção errada dos propósitos da investigação clínica por parte dos doentes. A investigação tem como principal objetivo contribuir para a evolução do conhecimento científico, independentemente dos indivíduos envolvidos saírem ou não beneficiados com a intervenção (Tucker et al., 2014).
- Questionação ética relativamente à aprovação de certos estudos que implicam uma razão risco/benefício desfavorável (Henderson et al., 2018).

De modo a enfrentar estas questões éticas e sociais, deve ser explicada metodicamente ao público em geral a elevada complexidade envolvida nestes estudos, deve-se proceder a uma seleção cuidada dos participantes e a uma monitorização ao longo de todo o processo, para redução de riscos (Henderson et al., 2018).





## 7. Conclusão

Há cerca de 30 anos atrás, a infecção pelo HIV era considerada uma sentença de morte, sem quaisquer formas terapêuticas de prevenção, tratamento ou cura. Atualmente, não só é possível controlar a doença através da terapêutica antirretroviral, como também já existem estudos desenvolvidos que visam alcançar a cura, apesar dos diferentes desafios presentes em cada método.

Não obstante, as taxas de prevalência e de incidência continuam bastante altas a nível global, encontrando-se ainda longe de atingir a meta ambicionada pela OMS – 90:90:90. A África Oriental e Meridional apresenta os valores mais altos, sendo que em cada 1.000 habitantes, existem quase 2 novos casos de infecção pelo HIV. Portugal, apesar de apresentar valores mais baixos, são igualmente preocupantes, significando que é necessário proceder a esforços para que as pessoas sejam diagnosticadas precocemente, o que, como referido, pode aumentar significativamente a sua qualidade de vida, impedindo que os níveis de linfócitos T-CD4+ desçam a um nível em que, apesar da terapêutica, os sujeitem a comorbilidades causadas pelo enfraquecimento do sistema imunitário.

Atualmente, entre as estratégias mais promissoras para a cura funcional, estão incluídas: vacinas terapêuticas, transferência de genes mediada por um vetor e o “block-and-lock”. As estratégias estudadas para a cura definitiva englobam: edição genómica, terapia genética e “shock-and-kill”. Relativamente à cura funcional, também se verificou que seria possível obter uma remissão viral prolongada em crianças infetadas verticalmente (de mãe para filho) tratadas imediatamente após o seu nascimento, destacando-se a “criança de Mississipi”. Outros casos de cura funcional temporária foram os pacientes de Boston e os “controladores pós-tratamento” (estudo VISCONTI)

Porém, a maior barreira entre os investigadores e o alcance de uma cura para o HIV persiste – a formação de reservatórios virais, os quais podem ser linfócitos T-CD4+ de memória, linfócitos T<sub>fh</sub>, macrófagos ou astrócitos, locais onde o vírus fica armazenado num estado latente em diversos locais do organismo. Timothy Ray Brown, o “Paciente de Berlim”, foi, até hoje, o único caso em que foi possível erradicar todos os reservatórios e células infetadas do organismo de um indivíduo infetado com HIV, tendo alcançado uma cura efetiva.



## 8. Bibliografia

- Ahmad, A., & Rinaldo, C. R. (2017). A novel anti-HIV immunotherapy to cure HIV. *Aids*, 31(3), 447–449. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001331>
- Alemayehu, M., Yisehak, Y., Alaro, W., & Alemayehu, B. (2017). Opportunistic Infections among HIV/AIDS Patients taking Anti-Retroviral Therapy at Tertiary Care Hospital in Wolaita Zone, Southern Ethiopia. *Journal of AIDS & Clinical Research*, 08(02). <https://doi.org/10.4172/2155-6113.1000665>
- Ananworanich, J. (2015). What Will It Take to Cure HIV? *Topics in Antiviral Medicine*, 23(2), 80–84.
- Araki, M., & Ishii, T. (2014). International regulatory landscape and integration of corrective genome editing into in vitro fertilization. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-108>
- Archin, N. M., & Margolis, D. M. (2014). Emerging strategies to deplete the HIV reservoir. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 27(1), 29–35. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000026>
- Bahcall, O. (2014). HIV-1 origins and spread. *Nature Genetics*, 46(11), 1159–1159. <https://doi.org/10.1038/ng.3133>
- Barton, K., Winckelmann, A., & Palmer, S. (2016). HIV-1 Reservoirs During Suppressive Therapy. *Trends in Microbiology*, 24(5), 345–355. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.01.006>
- Benjamin, R., Berges, B. K., Solis-Leal, A., Igbinedion, O., Strong, C. L., & Schiller, M. R. (2016). TALEN gene editing takes aim on HIV. *Human Genetics*, 135(9), 1059–1070. <https://doi.org/10.1007/s00439-016-1678-2>
- Bick, A. J., & Hapgood, J. P. (2018). HIV-1 Latency Is Maintained by the Estrogen Receptor. *Trends in Microbiology*, xx, 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.09.005>
- Boritz, E. A., & Douek, D. C. (2017). Perspectives on human immunodeficiency virus (HIV) Cure: HIV persistence in tissue. *Journal of Infectious Diseases*, 215(Suppl 3), S128–S133. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix005>
- Brady, J. M., Baltimore, D., Balazs, A. B., & Engineering, B. (2018). a Method for HIV Prevention, 275(1), 324–333. <https://doi.org/10.1111/imr.12478>.Antibody
- Brodin, J., Zanini, F., Thebo, L., Lanz, C., Bratt, G., Neher, R. A., & Albert, J. (2016). Establishment and stability of the latent HIV-1 DNA reservoir. *ELife*,

- 5(November2016), 1–15. <https://doi.org/10.7554/eLife.18889>
- Brown, T. R. (2015). I Am the Berlin Patient: A Personal Reflection. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 31(1), 2–3. <https://doi.org/10.1089/aid.2014.0224>
- Bruner, K. M., Hosmane, N. N., & Siliciano, R. F. (2015). Towards an HIV-1 cure: Measuring the latent reservoir. *Trends in Microbiology*, 23(4), 192–203. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.01.013>
- Bunders, M. J., & Altfeld, M. (2017). Can NK cells purge HIV sanctuaries? *Nature Medicine*, 23(11), 1254–1255. <https://doi.org/10.1038/nm.4434>
- Burgener, A., McGowan, I., & R Klatt, N. (2015). HIV and mucosal barrier interactions: consequences for transmission and pathogenesis. *ScienceDirect*, 36, 22–30.
- Buzon, M. J., Martin-Gayo, E., Pereyra, F., Ouyang, Z., Sun, H., Li, J. Z., ... Lichterfeld, M. (2014). Long-Term Antiretroviral Treatment Initiated at Primary HIV-1 Infection Affects the Size, Composition, and Decay Kinetics of the Reservoir of HIV-1-Infected CD4 T Cells. *Journal of Virology*, 88(17), 10056–10065. <https://doi.org/10.1128/JVI.01046-14>
- Caskey, M., Klein, F., & Nussenzweig, M. C. (2016). Broadly Neutralizing Antibodies for HIV-1 Prevention or Immunotherapy. *The New England Journal of Medicine*, 2019–2021.
- Chun, T. W., Moir, S., & Fauci, A. S. (2015). HIV reservoirs as obstacles and opportunities for an HIV cure. *Nature Immunology*, 16(6), 584–589. <https://doi.org/10.1038/ni.3152>
- Coutinho, C., Sarmiento, B., & das Neves, J. (2017). Targeted microbicides for preventing sexual HIV transmission. *Journal of Controlled Release*, 266(August), 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.030>
- Darcis, G., Van Driessche, B., & Van Lint, C. (2016). Preclinical shock strategies to reactivate latent HIV-1: An update. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 11(4), 388–393. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000288>
- Deeks, S. G., Lewin, S. R., Ross, A. L., Ananworanich, J., Benkirane, M., Cannon, P., ... Zack, J. (2016). International AIDS Society global scientific strategy: Towards an HIV cure 2016. *Nature Medicine*, 22(8), 839–850. <https://doi.org/10.1038/nm.4108>
- Didigu, C., & Doms, R. (2014). Gene therapy targeting HIV entry. *Viruses*, 6(3), 1395–1409. <https://doi.org/10.3390/v6031395>
- Dinh, D. M., Volpe, G. E., Duffalo, C., Bhattachandra, S., Tai, A. K., Kane, A. V., ... Ward, H. D. (2015). Intestinal Microbiota, microbial translocation, and systemic

- inflammation in chronic HIV infection. *Journal of Infectious Diseases*, 211(1), 19–27. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu409>
- Do, T., Murphy, G., Earl, L. A., Del Prete, G. Q., Grandinetti, G., Li, G.-H., ... Subramaniam, S. (2014). Three-Dimensional Imaging of HIV-1 Virological Synapses Reveals Membrane Architectures Involved in Virus Transmission. *Journal of Virology*, 88(18), 10327–10339. <https://doi.org/10.1128/JVI.00788-14>
- Douek, D. C. (2018). HIV Infection: Advances Toward a Cure. *Topics in Antiviral Medicine*, 25(4), 121–125. <https://doi.org/10.1002/9783527632794.fmatter>
- Esra, R. T., Olivier, A. J., Passmore, J. A. S., Jaspan, H. B., Harryparsad, R., & Gray, C. M. (2016). Does HIV exploit the inflammatory milieu of the male genital tract for successful infection? *Frontiers in Immunology*, 7(JUN), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00245>
- Faria, N. R., Rambaut, A., Suchard, M. A., Baele, G., Bedford, T., Ward, M. J., ... Lemey, P. (2014). The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science*, 346(6205), 56–61. <https://doi.org/10.1126/science.1256739>
- Frangé, P., Faye, A., Avettand-Feno, V., Bellaton, E., Descamps, D., Angin, M., ... Saz-Ciri, A. (2016). HIV-1 virological remission lasting more than 12 years after interruption of early antiretroviral therapy in a perinatally infected teenager enrolled in the French ANRS EPF-CO10 paediatric cohort: A case report. *The Lancet HIV*, 3(1), e49–e54. [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(15\)00232-5](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(15)00232-5)
- Freed, E. O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nature Reviews Microbiology*, 13(8), 484–496. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3490>
- Galvis, A. E., & Vegas, L. (2015). An RNA Lariat Intermediate in HIV-1 cDNA Synthesis, (November).
- Gautam, R., Nishimura, Y., Pegu, A., Nason, M. C., Klein, F., Gazumyan, A., ... Martin, M. A. (2016). A single injection of anti-HIV-1 antibodies protects against repeated SHIV challenges. *Nature*, 533(7601), 105–109. <https://doi.org/10.1038/nature17677>
- Gay, C. L., Bosch, R. J., Ritz, J., Hataye, J. M., Aga, E., Tressler, R. L., ... Eron, J. J. (2017). Clinical trial of the anti-PD-L1 antibody BMS-936559 in HIV-1 infected participants on suppressive antiretroviral therapy. *Journal of Infectious Diseases*, 215(11), 1725–1733. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix191>
- Geng, G., Liu, B., Chen, C., Wu, K., Liu, J., Zhang, Y., ... Zhang, H. (2016). Development of an attenuated tat protein as a highly-effective agent to specifically activate HIV-1 latency. *Molecular Therapy*, 24(9), 1528–1537.

- <https://doi.org/10.1038/mt.2016.117>
- Gorenec, L., Zidovec Lepej, S., Grgic, I., Planinic, A., Iscic Bes, J., Vince, A., & Begovac, J. (2016). The comparison of Th1, Th2, Th9, Th17 and Th22 cytokine profiles in acute and chronic HIV-1 infection. *Microbial Pathogenesis*, 97, 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.06.008>
- Goulder, P. J., Lewin, S. R., & Leitman, E. M. (2016). Paediatric HIV infection: The potential for cure. *Nature Reviews Immunology*, 16(4), 259–271. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.19>
- Guangdi, L., & Clercq, E. d. (2016). HIV Genome-Wide Protein Associations: a Review of 30 Years of Research. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80, 679–731.
- Henderson, G. E., Peay, H. L., Kroon, E., Cadigan, R. J., Meagher, K., Jupimai, T., ... Rennie, S. (2018). Ethics of treatment interruption trials in HIV cure research: Addressing the conundrum of risk/benefit assessment. *Journal of Medical Ethics*, 44(4), 270–276. <https://doi.org/10.1136/medethics-2017-104433>
- HIV “reservoirs” may form earlier than expected. (2014).
- Hong, F. F., & Mellors, J. W. (2015). Changes in HIV reservoirs during long-term antiretroviral therapy. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 10(1), 43–48. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000119>
- Horwitz, J. A., Bar-On, Y., Lu, C. L., Fera, D., Lockhart, A. A. K., Lorenzi, J. C. C., ... Nussenzweig, M. C. (2017). Non-neutralizing Antibodies Alter the Course of HIV-1 Infection In Vivo. *Cell*, 170(4), 637–648.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.048>
- Hütter, G., Nowak, D., Mossner, M., Ganepola, S., Müßig, A., Allers, K., ... Thiel, E. (2009). Long-Term Control of HIV by. *New England Journal of Medicine*, 360(7), 692–698. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802905>
- Jagarapu, A., Cannon, L., & Zurakowski, R. (2017). Experiment design for early molecular events in HIV infection. *Proceedings of the American Control Conference*, 122–127. <https://doi.org/10.23919/ACC.2017.7962941>
- Johnston, R. (2016). Gene Therapy to Cure HIV: Where to from Here? *AIDS Patient Care and STDs*, 30(12), 531–533. <https://doi.org/10.1089/apc.2016.0240>
- Julg, B., & Alter, G. (2016). Broadly Neutralizing Antibodies: Magic Bullets against HIV? *Immunity*, 44(6), 1253–1254. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.06.012>
- Kelley, C. F., Kraft, C. S., De Man, T. J. B., Duphare, C., Lee, H. W., Yang, J., ... Amara,

- R. R. (2017). The rectal mucosa and condomless receptive anal intercourse in HIV-negative MSM: Implications for HIV transmission and prevention. *Mucosal Immunology*, 10(4), 996–1007. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.97>
- Kessing, C. F., Nixon, C. C., Li, C., Tsai, P., Takata, H., Mousseau, G., ... Valente, S. T. (2017). In Vivo Suppression of HIV Rebound by Didehydro-Cortistatin A, a “Block-and-Lock” Strategy for HIV-1 Treatment. *Cell Reports*, 21(3), 600–611. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.080>
- Komor, A. C., Badran, A. H., & Liu, D. R. (2017). CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes. *Cell*, 168(1–2), 20–36. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.044>
- Kurapati, K. R. V., Samikkannu, T., Atluri, V. S. R., & Nair, M. P. N. (2015). Cell cycle checkpoints and pathogenesis of HIV-1 infection: A brief overview. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 26(1), 1–11. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2014-0018>
- Lee, C. (2015). Options for the treatment of HIV: A review. *Pharmacy Today*, 21(4), 60–61. [https://doi.org/10.1016/S1042-0991\(15\)30392-3](https://doi.org/10.1016/S1042-0991(15)30392-3)
- Limsirichai, P., Gaj, T., & Schaffer, D. V. (2016). CRISPR-mediated Activation of Latent HIV-1 Expression. *Molecular Therapy*, 24(3), 499–507.
- Liu, J., Gaj, T., Wallen, M. C., & Barbas, C. F. (2015a). Improved cell-penetrating zinc-finger nuclease proteins for precision genome engineering. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 4(3), e232. <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.6>
- Liu, J., Gaj, T., Wallen, M. C., & Barbas, C. F. (2015b). Improved cell-penetrating zinc-finger nuclease proteins for precision genome engineering. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 4(3), e232. <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.6>
- Maartens, G., Celum, C., & Lewin, S. R. (2014). HIV infection: Epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *The Lancet*, 384(9939), 258–271. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60164-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60164-1)
- McCauley, M. J., Rouzina, I., Manthei, K. A., Gorelick, R. J., Musier-Forsyth, K., & Williams, M. C. (2015). Targeted binding of nucleocapsid protein transforms the folding landscape of HIV-1 TAR RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(44), 13555–13560. <https://doi.org/10.1073/pnas.1510100112>
- Melhuish, A., & Lewthwaite, P. (2018). Natural history of HIV and AIDS. *Medicine (United Kingdom)*, 46(6), 356–361. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2018.03.010>
- Menezes, T. O. de A., Rodrigues, M. C., Nogueira, B. M. L., de Menezes, S. A. F., da

- Silva, S. H. M., & Vallinoto, A. C. R. (2015). Oral and systemic manifestations in HIV-1 patients. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48(1), 83–86. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0179-2014>
- Mousseau, G., Mediouni, S., & Valente, S. T. (2015). Targeting HIV Transcription: The Quest for a Functional Cure. *Springer International Publishing*.
- N. Borducchi, E., Liu, J., P. Nkolola, J., M. Cadena, A., Yu, W.-H., Fischinger, S., ... Barouch, D. H. (2018). Antibody and TLR7 agonist delay viral rebound in SHIV-infected monkeys. *Nature*.
- Peeters, M., Jung, M., & Ayoub, A. (2013). The origin and molecular epidemiology of HIV. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. <https://doi.org/10.1586/14787210.2013.825443>
- Rainwater-Lovett, K., Luzuriaga, K., & Persaud, D. (2015). Very early combination antiretroviral therapy in infants: Prospects for cure. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 10(1), 4–11. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000127>
- Real, F., Sennepin, A., Ganor, Y., Schmitt, A., & Bomsel, M. (2018). Live Imaging of HIV-1 Transfer across T Cell Virological Synapse to Epithelial Cells that Promotes Stromal Macrophage Infection. *Cell Reports*, 23(6), 1794–1805. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.028>
- Robb, M. L., & Ananworanich, J. (2016). Lessons from acute HIV infection. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 11(6), 555–560. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000316>
- Rosenbloom, D. I. S., Hill, A. L., Laskey, S. B., & Siliciano, R. F. (2017). Re-evaluating evolution in the HIV reservoir. *Nature*, 551(7681), E6–E9. <https://doi.org/10.1038/nature24634>
- Rutstein, S. E., Pettifor, A. E., Phiri, S., Kamanga, G., Hoffman, I. F., Hosseinipour, M. C., ... Miller, W. C. (2016). Incorporating acute HIV screening into routine HIV Testing at sexually transmitted infection clinics, and HIV testing and counseling centers in Lilongwe, Malawi. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 71(3), 272–280. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000000853>
- Saag, M. S., Benson, C. A., Gandhi, R. T., Hoy, J. F., Landovitz, R. J., Mugavero, M. J., ... Volberding, P. A. (2018). Antiretroviral drugs for treatment and prevention of HIV infection in adults: 2018 recommendations of the international antiviral society-USA panel. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 320(4), 379–396. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.8431>



- Saleh, S., Vranckx, L., Gijsbers, R., Christ, F., & Debyser, Z. (2017). Insight into HIV-2 latency may disclose strategies for a cure for HIV-1 infection. *Journal of Virus Eradication*, 3(1), 7–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28275453> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5337426>
- Sattentau, Q. J., & Stevenson, M. (2016). Macrophages and HIV-1: An Unhealthy Constellation. *Cell Host and Microbe*, 19(3), 304–310. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.02.013>
- Scarborough, R. J., & Gatignol, A. (2018). RNA interference therapies for an HIV-1 functional cure. *Viruses*, 10(1), 1–19. <https://doi.org/10.3390/v10010008>
- Schreiber, T., & Tissier, A. (2016). Libraries of Synthetic TALE-Activated Promoters: Methods and Applications. *Methods in Enzymology*, 576, 361–377.
- Siliciano, J. D., & Siliciano, R. F. (2016). Recent developments in the effort to cure HIV infection: Going beyond N = 1. *Journal of Clinical Investigation*, 126(2), 409–414. <https://doi.org/10.1172/JCI86047>
- Søgaard, O. S., Graversen, M. E., Leth, S., Olesen, R., Brinkmann, C. R., Nissen, S. K., ... Tolstrup, M. (2015). The Depsipeptide Romidepsin Reverses HIV-1 Latency In Vivo. *PLoS Pathogens*, 11(9), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005142>
- Stefanov, Y., & Voronin, Y. (2010). Human immunodeficiency virus (HIV).
- Strongin, Z., Sharaf, R., VanBelzen, D. J., Jacobson, J. M., Connick, E., Volberding, P., ... Li, J. Z. (2018). Effect of Short-Term Art Interruption on Levels of Integrated Hiv Dna. *Journal of Virology*, (March), JVI.00285-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00285-18>
- Tanaka, L. F., Latorre, M. R. D. O., Gutierrez, E. B., Curado, M. P., Froeschl, G., Heumann, C., & Herbing, K. H. (2018). Risk for cancer among people living with AIDS, 1997-2012: The São Paulo AIDS-cancer linkage study. *European Journal of Cancer Prevention*, 27(4), 411–417. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000339>
- Tebas, P. (2018). Prospects for cure of HIV. *International Journal of Infectious Diseases*, 73, 40. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.04.3512>
- The columnar epithelium of the endocervix. (2014).
- Tucker, J. D., Rennie, S., Bangsberg, D., Cai, W., Cheng, B., Crane, J., ... Tucker, J. D. (2014). Social and ethical implications of HIV cure research. *Aids*, 28(9), 1247–1250. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000210>

UNIT 5 VARIOUS MODES OF TRANSMISSION OF HIV. (n.d.).

- van Hijum, S., Medema, M. H., & Kuipers, O. P. (2009). Microbiology and Molecular Biology Reviews. *Mechanisms and Evolution of Control Logic in Prokaryotic Transcriptional Regulation*, 73(3), 481–+. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00035-13>
- Vieillard, V., Gharakhanian, S., Lucar, O., Katlama, C., Launay, O., Autran, B., ... Debré, P. (2016). Perspectives for immunotherapy: which applications might achieve an HIV functional cure? *Oncotarget*, 7(25). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7793>
- Visseaux, B., Damond, F., Matheron, S., Descamps, D., & Charpentier, C. (2016). Hiv-2 molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*, 46, 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.010>
- Vitali, D., Wessels, J. M., & Kaushic, C. (2017). Role of sex hormones and the vaginal microbiome in susceptibility and mucosal immunity to HIV-1 in the female genital tract. *AIDS Research and Therapy*, 14(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s12981-017-0169-4>
- Wainberg, M. A., Han, Y.-S., & Mesplède, T. (2016). Might dolutegravir be part of a functional cure for HIV? *Canadian Journal of Microbiology*, 62(5), 375–82. <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0725>
- Wong, J. K., & Yukl, S. A. (2016). Tissue reservoirs of HIV. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 11(4), 362–370. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000293>
- Xu, W., Li, H., Wang, Q., Hua, C., Zhang, H., Li, W., ... Lu, L. (2017). Advancements in Developing Strategies for Sterilizing and Functional HIV Cures. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6096134>
- Yao, X. D., Omange, R. W., Henrick, B. M., Lester, R. T., Kimani, J., Ball, T. B., ... Rosenthal, K. L. (2014). Acting locally: Innate mucosal immunity in resistance to HIV-1 infection in Kenyan commercial sex workers. *British Dental Journal*, 217(2), 268–279. <https://doi.org/10.1038/mi.2013.44>
- Zhu, W., Lei, R., Le Duff, Y., Li, J., Guo, F., Wainberg, M. A., & Liang, C. (2015). The CRISPR/Cas9 system inactivates latent HIV-1 proviral DNA. *Retrovirology*, 12(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12977-015-0150-z>